

09/647543

REC'D	02 JUL 1999
WIPO	PCT

OFICINA ESPAÑOLA

de

5

PATENTES y MARCAS

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9800699, presentada en este Organismo, con fecha 2 de Abril de 1998.

Madrid, 21 de mayo de 1999

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M. MADRUGA

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD

<p>(1) <input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA</p>		<p>(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD/...../.....</p>	
		<p>MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD/...../.....</p>	
<p>(4) SOLICITANTE(S) URQUIMA, S.A.</p>		<p>NOMBRE _____</p>	
		<p>DNI _____</p>	
<p>(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE DOMICILIO Dega Bahi, 59-67 LOCALIDAD BARCELONA PROVINCIA BARCELONA PAIS RESIDENCIA ESPAÑA NACIONALIDAD ESPAÑOLA</p>		<p>OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Dpto. SECRETARIA GENERAL Panamá, 1. Madrid 28071 REPROGRAFIA TELEFONO _____ CODIGO POSTAL 0,810,2,6 CODIGO PAIS E.S CODIGO NACION E.S</p>	
<p>(6) INVENTOR(ES)</p> <p>(7) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O UNICO INVENTOR</p>		<p>(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO <input type="checkbox"/> INVENC LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION</p>	
<p>APELLIDOS CARDOZA SILVA; MORALEJO LORENZO</p>		<p>NOMBRE ROSA ELENA FCO. JOSE</p>	
		<p>NACIONALIDAD MEXICANA ESPAÑOLA</p>	
<p>(9) TITULO DE LA INVENCION "PROMOTOR Y CONSTRUCCIONES PARA EXPRESION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN HONGOS FILAMENTOSOS"</p>			
<p>(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.</p>		<p><input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO</p>	
<p>(11) EXPOSICIONES OFICIALES</p>			
<p>LUGAR</p>		<p>FECHA</p>	
<p>(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD</p>			
<p>PAIS DE ORIGEN</p>		<p>COD. PAIS NUMERO FECHA</p>	
<p>(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.</p>		<p><input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO</p>	
<p>(14) REPRESENTANTE APPELLIDOS ISERN JARA</p>		<p>NOMBRE JAIME CODIGO 13,7,5,1</p>	
<p>DOMICILIO AVDA. PAU CASALS, 22</p>		<p>LOCALIDAD BARCELONA PROVINCIA BARCELONA COD. POSTAL 0,80,2,1</p>	
<p>(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN</p>		<p>FIRMA DEL FUNCIONARIO <i>J. I. JARA</i></p>	
<p><input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. N.º DE PAGINAS..59 <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. N.º DE PAGINAS..4 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. N.º DE PAGINAS..18 <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input checked="" type="checkbox"/> OTROS DISQUETE CON SECUENCIAS FORMATO PatentIn</p>	
<p>(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION</p>		<p>FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE <i>J. I. JARA</i></p>	
<p>Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.</p>		<p>Fdo.: JORGE ISERN JARA <i>J. I. JARA</i></p>	

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NUMERO DE SOLICITUD

P.98.000.69.0
FECHA DE PRESENTACION

98 ABR -2 11:22

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

PATENTE DE INVENCION
 MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES		APELLIDOS O RAZON SOCIAL		NOMBRE	DNI
(6) INVENTORES		APELLIDOS		NOMBRE	NAC.
GUTIERREZ MARTIN CASQUEIRO BLANCO HIJARRUBIA IBRAHIM MARTIN MARTIN SISNIEGA BARROSO DEL RIO PERICACHO FAUS SANTASUSANA				SANTIAGO JAVIER Má JOSE JUAN FCO. HEIDI JOSE LUIS IGNACIO	ES ES ES ES ES ES ES
(11) EXPOSICIONES OFICIALES					
LUGAR:		FECHA:			
(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD					
PAIS DE ORIGEN		CODIGO	NUMERO	FECHA	

68-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PATENTE

RESUMEN Y GRAFICO

NUMERO DE SOLICITUD	9800599
FECHA DE PRESENTACIÓN	98 ABR -2 11:22

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos.

Se describe un nuevo promotor para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos (1-740) en SEQ ID No. 1), que es el promotor gdhA del gen de la glutamato deshidrogenasa A de *Aspergillus niger* var. awamori, así como una nueva secuencia de ADN que codifica la glutamato deshidrogenasa (741-2245 en SEQ ID No.1). Para la expresión de proteínas recombinantes resultan especialmente útiles las construcciones de ADN que comprenden el nuevo promotor, seguido de una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión formada por: un gen que codifique la proteína a obtener (p. ej. la taumatinina), una secuencia espaciadora tipo KEX2, y un gen altamente expresado de un hongo filamentoso. Entre las ventajas de este sistema están: altas concentraciones de proteína expresada, menores tiempos de fermentación, y utilización de una fuente de nitrógeno más económica.

GRAFICO

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DATOS DE PRIORITY			A) ② PATENTE DE INVENTION	
① NUMERO	② FECHA	③ PAIS	④ NUMERO DE SOLICITUD	
			P 9800699	
			⑤ FECHA DE PRESENTACION	

① SOLICITANTE(S)	NACIONALIDAD	
URQUIMA S.A.	española	
DOMICILIO	Degà Bahí 59-67. 08026 Barcelona. España	

② INVENTOR(ES) Rosa Elena Cardosa Silva; Rro. José Moralejo Lorenzo; Santiago Gutiérrez Martín; Javier Casqueiro; M^a José Hijamibia; Juan Rro. Martín; Heidi Sisniega; Jose Luis del Río; Ignacio Faus

③ TITULAR(ES)	URQUIMA S.A.
---------------	--------------

④ N.º DE PUBLICACION	⑤ FECHA DE PUBLICACION	⑥ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA	GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)
⑦ Int. Cl.	OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Dpto. SECRETARIA GENERAL REPROGRAFIA Panamá, 1 - Madrid 28071		
⑧ TITULO	<p>Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos</p>		

⑨ RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA SIN VALOR JURIDICO)	<p><u>Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos</u></p> <p>Se describe un nuevo promotor para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos (1-740 en SEQ ID No. 1), que es el promotor <u>gdhA</u> del gen de la glutamato deshidrogenasa A de <u>Aspergillus niger var. awamori</u>, así como una nueva secuencia de ADN que codifica la glutamato deshidrogenasa (741-2245 en SEQ ID No. 1). Para la expresión de proteínas recombinantes resultan especialmente útiles las construcciones de ADN que comprenden el nuevo promotor, seguido de una secuencia de ADN que codifica una proteína de fusión formada por: un gen que codifique la proteína a obtener (p. ej. la taumatinina), una secuencia espaciadora tipo KEX2, y un gen altamente expresado de un hongo filamento. Entre las ventajas de este sistema están: altas concentraciones de proteína expresada, menores tiempos de fermentación, y utilización de una fuente de nitrógeno más económica.</p>
--	--

Promotor y construcciones para expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos

Esta invención se refiere a mejoras en la secreción
5 de proteínas, particularmente de proteínas de fusión,
mediante tecnología de ADN recombinante, usando
hongos filamentosos como huéspedes. Las mejoras se
refieren principalmente al uso de un nuevo promotor y
de nuevas construcciones de ADN que lo contienen.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las taumatinas son proteínas de sabor muy dulce y
con capacidad de aumentar la palatabilidad
15 (potenciación o mejora de otros sabores) de los
alimentos (M.Witty, J.D. Higginbotham, *Thaumatin*,
1994, CRC Press, Boca Ratón, Florida). Actualmente,
en la industria las taumatinas se extraen de los
arilos de los frutos de la planta Thaumatococcus
20 daniellii Benth (M.Witty, J.D. Higginbotham,
Thaumatin, 1994, CRC Press, Boca Ratón, Florida). Las
taumatinas se pueden aislar de dichos arilos en, al
menos, cinco formas diferentes (I, II, III, b y c),
las cuales se pueden separar por cromatografía de
25 intercambio iónico. Todas ellas son polipéptidos de
una sola cadena de 207 aminoácidos y con un peso
molecular de aproximadamente 22.000 daltons. Las
taumatinas I y II, que son predominantes en los
arilos y tienen secuencias muy semejantes de
30 aminoácidos, son mucho más dulces que la sacarosa
(100.000 veces más dulces según una estimación).
Además de ser productos naturales, las taumatinas I
y II no son tóxicas, por lo que constituyen un buen
sustitutivo de los edulcorantes comunes en
35 alimentación animal o humana.

A pesar de sus ventajas, la utilización industrial de taumatinas de origen vegetal está muy limitada por las grandes dificultades que conlleva la obtención del fruto del que se extrae. Así, la

5 planta productora, T. daniellii, no sólo requiere un clima tropical y una polinización por insectos, sino que además ha de cultivarse intercalada con otros árboles y, con todo, tres cuartas partes de sus flores no llegan a fructificar.

10 Aunque ha habido intentos de producir taumatinas por ingeniería genética en diferentes huespedes, hasta ahora los resultados han sido considerados desalentadores, por lo que la cantidad de taumatinas

15 disponible industrialmente es muy escasa, y a un precio muy elevado.

Los hongos filamentosos han sido utilizados como huespedes para la expresión de proteínas recombinantes.

20 Por ejemplo, Aspergillus niger, var. awamori ha sido utilizado para la producción de proteínas recombinantes, tales como la glucoamilasa, quimosina bovina, lactoferrina humana, etc.

25 Algunas proteínas recombinantes (por ejemplo la interleucina-6 y la taumatina) han sido muy difíciles de expresar en hongos filamentosos. La patente Europea EP 684.312 describe una proceso para la preparación de taumatina recombinante. Un problema de este proceso

30 radica en que los rendimientos obtenidos son bajos en comparación a lo que se requiere para la producción industrial de taumatinas. Por lo tanto, para intentar expresar en mayores concentraciones aquellas proteínas recombinantes (por ejemplo la taumatina) que han sido

35 hasta ahora difíciles de obtener, resulta necesario e

interesante el desarrollo de nuevos y más eficientes sistemas de expresión.

Es conocido que las productividades a la hora de producir proteínas recombinantes pueden ser mejoradas si la proteína de interés es expresada como una proteína de fusión con otra proteína. Esta otra proteína, denominada "proteína carrier" acostumbra a ser una proteína de origen fúngico y altamente expresada. Además es interesante que esta cassette de expresión esté bajo el control transcripcional de un promotor fúngico fuerte. Hasta ahora, el sistema de expresión más común y utilizado contiene el promotor y gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger, var. awamori, como promotor y gen codificador de la "proteína carrier", respectivamente (P.P. Ward et al., Biotechnology 1995, vol. 13, pp. 498-502). Sin embargo, en algunos casos la utilización de este sistema de expresión no garantiza la obtención de niveles elevados de proteína recombinante. Uno de estos casos problemáticos es precisamente el de la expresión de taumatina recombinante en hongos filamentosos.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un nuevo sistema de expresión que usa el promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de hongos filamentosos, particularmente de Aspergillus niger, var. awamori.

Uno de los aspectos de la presente invención es un nuevo promotor para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos, que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementaria- seleccionada del grupo formado por: a) la secuencia

numerada 1-740 en la adjunta SEQ ID No. 1; b) una secuencia análoga a la definida en (a); y una secuencia que, bajo condiciones estrictas, se hibrida a la definida en (a). Especialmente preferida 5 es la secuencia numerada 1-740 en la SEQ ID No. 1, que corresponde al promotor gdhA del gen de la glutamato deshidrogenasa A de Aspergillus niger var. awamori. Pero también son objeto de la presente invención el promotor gdh del gen de la glutamato 10 deshidrogenasa de Aspergillus niger, así como el promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de Aspergillus niger var. awamori.

Otro aspecto de la presente invención es la nueva 15 secuencia de ADN, purificada y aislada, que codifica una proteína glutamato deshidrogenasa y que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementaria- seleccionada del grupo formado por: a) la secuencia numerada 741-2245 en la adjunta SEQ ID No. 1; b) una 20 secuencia que es homóloga con la definida en (a); y c) una secuencia que, bajo condiciones estrictas, se hibrida a la definida en (a). En una realización particular la secuencia de nucleótidos seleccionada es la definida en (a). En otra realización particular 25 la proteína codificada es una glutamato deshidrogenasa de un hongo filamentoso, siendo especialmente preferida la glutamato deshidrogenasa A de un hongo filamentoso.

30 Otro aspecto de la presente invención está constituido por las nuevas proteínas codificadas por cualquiera de las secuencias de ADN antes definidas. En una realización particular, esta proteína tiene la secuencia de aminoácidos indicada en la adjunta SEQ 35 ID No. 2.

Otro aspecto de la presente invención lo constituyen las construcciones de ADN que comprenden: a) uno de los nuevos promotores antes definidos; b) una secuencia de ADN seleccionada del grupo formado por 5 el gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger var. awamori, el gen B2 de Acremonium chrysogenum, y cualquiera de las nuevas secuencias de ADN antes definidas; c) una secuencia espaciadora que, a su vez, contiene una secuencia procesadora KEX2; y d) un 10 gen -natural o sintético- codificador de taumatin I o II. En una realización particular, la construcción de ADN contiene el promotor que comprende la secuencia 1-740 en la adjunta SEQ ID No. 1. Son preferidas las realizaciones particulares que, en la 15 parte (b) de la construcción, contienen el gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger var. awamori, el gen B2 de Acremonium chrysogenum, o la secuencia de ADN donde la proteína codificada es la glutamato deshidrogenasa de un hongo filamentoso. Para la 20 preparación de taumatin, son especialmente preferidas las construcciones de ADN donde la secuencia de ADN en (d) es el gen sintético de la taumatin II proveniente del plásmido pThIX, descrito en EP 684.312.

25 La presente invención también se refiere a los cultivos de hongos filamentosos capaces de producir taumatin, que han sido transformados con plásmidos que contienen una de las construcciones antes mencionadas. Especialmente preferidos son los cultivos 30 donde el hongo filamentoso es Aspergillus niger o Aspergillus niger var. awamori.

35 También es objeto de la presente invención un procedimiento de producción de taumatin que

comprende los siguientes pasos: a) preparación de un plásmido de expresión que contiene una construcción de ADN de las definidas anteriormente; b) transformación de una cepa de hongo filamentoso con dicho plásmido de expresión; c) cultivo de la cepa transformada, en condiciones nutritivas apropiadas para la producción de taumatina, bien intracelularmente, bien extracelularmente, o bien de ambas maneras simultáneamente; d) según el caso, separación y purificación de taumatina a partir del caldo de fermentación.

Como se demuestra en la realización práctica de obtención de taumatina que se detalla, y se ilustra gráficamente en la Figura 12, el sistema de expresión de la presente invención tiene varias ventajas respecto a los conocidos en la técnica. Por un lado, se alcanzan concentraciones de proteína expresada de aproximadamente 100 mg/l, que son un orden de magnitud superiores a las mejores descritas (p.ej., con el procedimiento descrito en EP 684.312 se alcanzan concentraciones de 5-10 mg/l; cf. I. Faus et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998, en prensa). Por otra parte, para una misma proteína portadora ("carrier") y un mismo tiempo de fermentación, el uso del promotor de la presente invención conlleva mayor concentración de proteína expresada. Por último, y no menos importante, con las construcciones de la presente invención se puede usar una fuente de nitrógeno (sulfato amónico) más económica que la que se usa habitualmente (asparagina).

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

5 Figura 1, partes A, B, y C. Representación esquemática de los pasos realizados para la construcción de la cassette de expresión B2KEX.

10 Figura 2. Mapa de restricción de una región de 28,7 kb de ADN de A. awamori, incluyendo al gen gdhA. Mapa de los fagos FAN1 y FAN2. Las líneas gruesas indican la zona de solapamiento entre los dos fagos que contienen el gen gdhA. pB10, pB5.5 y PB1.7 indican los fragmentos de ADN subclonados en los correspondientes plásmidos. B = BamHI, S = Sal I.

15 20 Figura 3. Mapa de restricción del fragmento XbaI-BamHI de 2,1 kb del plásmido pB5.5 que fue secuenciado. El extremo 3' del gen gdhA está localizado en la parte izquierda del inserto en pB1.7. B = BamHI, E = EcoRI, EV = EcoRV, P = PstI, S = SalI, X = XbaI.

25 Figura 4, partes A y B. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las glutamato deshidrogenasas NADP-dependientes de A. awamori, A. nidulans (número de accesión de Genebank P18819), N. crassa (P00369), S. cerevisiae (P07262), S. occidentalis (P29507), A. bisporus (P54387), S. typhimurium (P15111), E. coli (P00370) y C. glutamicum (P31026). Los aminoácidos idénticos aparecen sombreados. Los motivos a-i, con varios aminoácidos conservados, están identificados.

30 35 Figura 5. Complementación de la mutación en gdhA en dos cepas de A. nidulans con el gen gdhA de A. awamori. Parte A: 1, mutante de A. nidulans A686; 2, transformante A686-4; 3, transformante A686-6; 4,

transformante A686-7. Parte B. 1, mutante A. nidulans A699; 2, transformante A699-2; 3, transformante A699-3; and 4, transformante A699-4.

5 Figura 6. Experimento de "primer extension" para identificar el extremo 5' del ARNm del gen gdhA. Una banda protegida (flecha) se observa en el carril correspondiente a la reacción de extensión (carril Pe). Los carriles G, A, T, C corresponden a reacciones de 10 secuenciación del fago M13 con el oligonucleótido ("primer") -40.

15 Figura 7. Análisis de "Northern blot" de los ARNm provenientes de los genes gdhA y β -actina. A: hibridación con una sonda interna al gen gdhA (fragmento PvuII de 0,694 kb). B: hibridación con la sonda del gen de la β -actina de A. nidulans como control.

20 Figura 8. Análisis de "Slot Blot" del ARNm proveniente del gen gdhA de A. awamori, durante una fermentación en medio MDFA con 1% glucosa y 10 mM sulfato amónico (parte A). A efectos comparativos, también se estudió el ARNm proveniente del gen de la 25 β -actina. Parte B: Niveles relativos de expresión del gen gdhA con respecto al gen de la β -actina. Parte C: Actividad de glutamato deshidrogenasas NADP- dependiente en aquellos mismos cultivos de los que se extrajo el ARNm.

30 Figura 9. Análisis de "Slot Blot" del ARNm proveniente del gen gdhA de A. awamori, durante una fermentación en medio MDFA con diferentes fuentes de nitrógeno (parte A). El medio contenía 10 mM sulfato amónico como control y ácido glutámico, glutamina, 35

nitrato sódico, nitrito sódico y asparagina, todos ellos en concentraciones de 10 mM. A efectos comparativos, también se estudió el ARNm proveniente del gen de la β -actina. Parte B: Niveles relativos de expresión del gen gdhA con respecto al gen de la β -actina.

Figura 10, partes A, B, y C. Representación esquemática de los pasos realizados para la 10 construcción de la cassette de expresión GDH.

Figura 11, partes A y B. Representación esquemática de los pasos realizados para la construcción de la cassette de expresión GPD.

Figura 12. Producción (expresada como concentración CT de proteína excretada en mg/l) de taumatina de las cepas de A. niger var. awamori TB2b1-44 y TGDTh-4 en fermentador. El medio utilizado fue el MDFA 15 suplementado con los componentes descritos a continuación. Cuadrados abiertos: Cepa TB2b1-44; 6.0% sacarosa, pH 6.2, "fed-batch" con asparagina. Círculos abiertos: TB2b1-44, 6.0% sacarosa, pH 6.2, "fed-batch" 20 con sulfato amónico. Triángulos cerrados: Cepa TGDTh-4; 6.0 % sacarosa, pH 6.2, "fed-batch" con sulfato amónico.

EXPOSICIÓN DETALLADA DE UN MODO DE REALIZACIÓN

30 A. Construcciones

El punto de partida para todas las construcciones que se han preparado en esta solicitud de patente es el plásmido pTIX, el cual ha sido descrito en la 35 solicitud de patente europea EP 684.312. Este plásmido

contiene: (i) un marcador de resistencia a la sulfanilamida; (ii) una secuencia de ADN que codifica a una proteína de fusión formada a su vez por (a) el gen sintético codificando a la taumatina II, (b) una secuencia separadora ("spacer") que contiene a su vez una secuencia de procesamiento del tipo KEX2, y (c) la secuencia completa (genómica) del gen de la glucoamilasa de Aspergillus niger; (iii) la secuencia señal de secreción ("pre") y la secuencia "pro" del gen de la glucoamilasa (glaA) de Aspergillus niger, y finalmente (iv) la región promotora del gen de la glucoamilasa (glaA) de Aspergillus niger.

En el contexto de la presente invención, tres nuevas cassettes de expresión fueron preparadas, las cuales contenían: (i) un marcador de resistencia a una droga (en la mayoría de casos el marcador utilizado fue el de resistencia a la fleomicina); (ii) una secuencia de ADN que codifica a una proteína de fusión formada a su vez por (a) el gen sintético codificando a la taumatina II, (b) una secuencia separadora que contiene a su vez una secuencia de procesamiento del tipo KEX2 y (c) una secuencia de ADN complementario (ADNc) que codifica a la mayoría de la secuencia de aminoácidos de la proteína B2 (excepto secuencias en el extremo carboxilo) de Acremonium chrysogenum; (iii) la secuencia señal de secreción del gen B2 de Acremonium chrysogenum, y (iv) tres regiones promotoras diferentes.

En todas las manipulaciones de clonaje y sub-clonaje descritas, Escherichia coli DH5a sirvió como huesped para todos los experimentos de transformación. E. coli WK6 fue utilizada como huesped para obtener ADN de simple cadena a partir de plásmidos pBluescript con el

EE-30-01 M

objetivo de secuenciar.

A1. Construcción de la cassette B2KEX

5 La proteína B2 es una proteasa extracelular producida por el hongo Acremonium chrysogenum. Esta proteína es expresada y secretada en las etapas tardías del crecimiento de Acremonium chrysogenum (entre 120 y 144 horas después del inicio del crecimiento).

10

El plásmido pJE1A (Laboratorio del Prof. Juan-Francisco Martín, Universidad de León, León, España) contiene la región promotora, péptido líder (incluyendo la señal de secreción) y región

15 codificante del gen B2 de Acremonium chrysogenum. El gen en sí tiene 1298 pares de bases y dos intrones. Estos dos intrones no están presentes en la secuencia que ha sido subclonada en pJE1A, ya que estas secuencias fueron obtenidas a partir de ADN

20 complementario (ADNc). Más adelante del codón iniciador de traducción (ATG) existe una región promotora de 477 pares de bases. Cuando Acremonium chrysogenum crece en un medio definido que contiene sacarosa y glucosa como fuentes de carbono, y

25 asparagina como fuente de nitrógeno, el gen se expresa a niveles máximos entre 72 y 96 horas después del inicio del cultivo.

30 Los pasos dados para la construcción de la cassette de expresión B2KEX se detallan en la Figura 1, partes A-C. El plásmido pJE1A se cortó secuencialmente con BamHI y NcoI, liberando un fragmento de 560 pares de bases (pb) que fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Este fragmento contiene la mayoría de la región codificante del gen B2, pero excluye el centro activo

de la proteína. En paralelo, el plásmido pJL43b (J.L. Barredo, Tesis Doctoral, Universidad de León, León, España) también fue digerido con BamHI y NcoI, liberándose un fragmento de 3740 pb, el cual fue 5 purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Este fragmento fue ligado con el fragmento BamHI-NcoI de 560 pb proveniente de pJE1A, obteniéndose el plásmido p43bB2CT (4300 pb).

10 El plásmido p43bB2CT fue digerido con NcoI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (con el objetivo de obtener extremos romos) y digerido con StuI, obteniéndose un fragmento de 3874 pb, el cual fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Los 15 oligonuclotidos de simple cadena ThS1 y ThS2 (ver secuencias de los oligonucleótidos más adelante) fueron utilizados, usando el plásmido pThIX como molde, para amplificar mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) las 20 secuencias KEX2, así como las secuencias de taumatina, presentes en pThIX. Los primeros 18 nucleótidos presentes en ThS1 corresponden a las secuencias KEX2. ...
P.:

ThS1: 5'- CGA ATG AAA AGG AAA AGG ATGGCCACCTTCGAG - 3'
25 Arg Met Lys Arg Lys Arg

ThS2: 5'- TTA TTA GGC GGT GGG GCA - 3'

30 Un fragmento de 655 pb se obtuvo mediante PCR utilizando el plásmido pThIX como molde y los oligonucleótidos ThS1 y ThS2 como "primers". Este fragmento de ADN fue ligado con el fragmento aislado con anterioridad y proveniente del p43bB2CT, obteniéndose el plásmido p43bB2CTTh. Este plásmido 35 (4530 pb) contiene parte del gen que codifica a la

proteína B2 fusionado a la secuencia KEX-2 y al gen sintético codificando a la taumatinina II. La señal de terminación de la transcripción presente en esta construcción es la del gen cycl de Saccharomyces cerevisiae.

5 El plásmido p43bB2CTTh fue digerido con BamHI, tratado con fosfatasa alcalina y purificado en un gel de agarosa al 0,8%. Un fragmento BamHI-BamHI de 900 pb 10 proveniente de pJE1A también fue aislado. La subsiguiente ligación de estos dos fragmentos de ADN resultó en el plásmido pB2KEX (5430 pb). El fragmento BamHI-BamHI de 900 pb proveniente de pJE1A contiene la secuencia promotora del gen B2 (477 pb), la secuencia 15 del péptido líder (318 pb) y 107 pb de secuencia amino terminal del gen B2.

El plásmido pB2KEX fue digerido con XbaI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I (con el 20 objetivo de obtener extremos romos) y digerido con SalI, obteniéndose un fragmento de 2400 pb que fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. El plásmido pLJ43b (4500 pb) fue digerido con HindIII, también tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa 25 I, y finalmente digerido con XhoI. Un fragmento de 4500 pb fue purificado como antes. Finalmente, los dos fragmentos purificados que acaban de ser descritos fueron ligados, generando el plásmido pB2KTh (6900 pb; Fig. 1C).

30

En la última etapa, los plásmidos pB2KTh y pLJ43b1 fueron digeridos con SacI y StuI, obteniéndose fragmentos de 5714 y 1305 pb respectivamente, los cuales fueron purificados en un gel de agarosa al 35 0,8%. Estos dos fragmentos fueron ligados,

obteniéndose el plásmido pB2KThb1 (7020 pb; Fig. 1C). El plásmido pJL43b1 es un derivado del plásmido pJL43b en el cual el promotor que expresa el gen de resistencia a fleomicina (el PpcbC de Penicillium chrysogenum) fue substituido por el promotor gpd de Aspergillus niger, var. awamori (P. Punt et al., Gene 1990, vol. 93, pp.101-109).

Este plásmido contiene un cassette para expresar taumatinina que está compuesta de: (i) un marcador de resistencia a fleomicina; (ii) Una secuencia de ADN que codifica a una proteína de fusión formada a su vez por (a) el gen sintético que codifica a la taumatinina II, (b) una secuencia separadora ("spacer") que 10 contiene a su vez una secuencia de procesamiento del tipo KEX2 y (c) una secuencia de ADN complementario (cADN) que codifica a la mayoría de la secuencia de aminoácidos de la proteína B2 (excepto secuencias en el extremo carboxilo) de Acremonium chrysogenum; (iii) 15 la secuencia señal de secreción del gen B2 de Acremonium chrysogenum y (iv) el promotor del gen B2 de Acremonium chrysogenum. En esta construcción particular, la expresión del gen de resistencia a la fleomicina (ble) está bajo el control del promotor del 20 gen del gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de Aspergillus nidulans.

A2. Construcción de la cassette de expresión GDHTh

30 A.2.1. Clonaje de un fragmento de ADN de Aspergillus niger, var. awamori contenido el gen gdhA.

La cepa A. awamori ATCC 22342 fue utilizada como fuente de ADN y ARN. Los mutantes de A. nidulans A686 35 (gdhA1, yA2, methH2, galA1) y A. nidulans A699 (gdhA1,

biA1) (J.R. Kinghorn, J.A. Pateman, J. Gen. Microbiol. 1973, vol. 78, pp. 39-46) fueron obtenidos del Fungal Genetics Stock Center, y utilizados para estudios de complementación con el gen gdhA de A. awamori. La auxotrofia parcial de glutamato de estas dos cepas fue confirmada por crecimiento en un medio con ácido glutámico ó con una concentración alta de sulfato amónico (100 mM) como fuente de nitrógeno. Ambos mutantes gdhA crecen muy pobemente en concentraciones altas de sulfato amónico, pero tienen un perfil de crecimiento normal cuando la fuente de nitrógeno es el ácido glutámico. La cepa E. coli NM539 fue utilizada como huesped para los derivados de fagos Lambda GEM12 (Promega Co., Wis).

15 Los hongos filamentosos fueron mantenidos de manera rutinaria en medio "Power" (F. Fierro et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996, vol. 43, pp. 597-604) a 30°C durante tres días. Los cultivos de siembra de A. awamori y A. nidulans en medio CM (conteniendo 20 g/l extracto de malta; 5 g/l extracto de levadura; 5 g/l glucosa) fueron inoculados con 10^6 esporas/ml y crecidos a 28°C en un incubador orbital G10 (New Brunswick Scientific, New Brunswick, N.J.) durante 48 h. Para el aislamiento y caracterización de ARNm del gen gdhA, cultivos de A. awamori en medio MDFA (Y.Q. Shen et al., J. Antibiot. 1984, vol. 37, pp. 503-511) fueron incubados con un 15% de cultivo de siembra y crecidos a 30°C por 48-72 h en un agitador giratorio, tal como se ha descrito anteriormente.

A.2.1.1. Genoteca de Aspergillus niger var. awamori (genómica)

35 Una genoteca de ADN total de A. awamori ATCC 22342

fue construída en un vector de bacteriofago Lambda GEM12. ADN total fue extraído y digerido parcialmente con Sau3AI, para obtener fragmentos de ADN de entre 17 y 23 kb. Este ADN fue purificado por centrifugación en 5 un gradiente de sacarosa, ligado a los brazos del fago Lambda GEM12, y empaquetado in vitro mediante el uso de un sistema de empaquetado Gigapack III Gold (Stratagene) resultando en un total de 8×10^4 fagos recombinantes.

10

En la siguiente etapa, y utilizando una sonda BamHI de 2,6 kb que contiene el gen gdhA de Neurospora crassa (J.H. Kinnaird, J.R.S. Fincham, Gene 1983, vol. 26, pp. 253-260), dos fagos, FAN1 y FAN2, que dieron una 15 señal de hibridación clara, fueron aislados y purificados mediante tres ciclos de infección. Los mapas de restricción de estos dos fagos mostraron que se solapaban en 7,2 kb. La región total de ADN clonada en estos dos fagos es de 28,7 kb.

20

Fragmentos BamHI de 1,7 , 5,5 y 10 kb fueron subclonados en el plásmido pBluescript KS+, dando lugar a los plásmidos pB1.7, pB5.5 y pB10, tal como se muestra en la Figura 2. Fueron secuenciados mediante 25 la generación de grupos ordenados de delecciones con el sistema "Erase-a-base" (Promega Co., Wis.), mediante digestión con la exonucleoasa III desde los extremos apropiados, seguido por la eliminación del ADN de simple cadena con la exonucleasa S1. La secuenciación 30 de los fragmentos del gen gdhA se llevó a cabo mediante el método de secuenciación de Sanger. La secuenciación de los clones de ADN complementario (ADNc), llevadas a cabo para secuenciar las uniones intrón-exón, se realizó utilizando la técnica PCR de 35 la manera siguiente: 90 ng de ADN de doble cadena

fueron secuenciados utilizando un sistema GeneAmp 2400 acoplado a un secuenciador automático ABI-PRISM 310 (Perkin Elmer). El análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos por ordenador se llevó a 5 cabo con los programas DNASTAR (DNASTAR, Inc., UK).

Las primeras rondas de secuenciación mostraron que una unidad de lectura abierta ("open reading frame", ORF1) existía en el extremo derecho del inserto de 5,5 kb de 10 pB5.5, la cual se extendía en la región izquierda del fragmento BamHI de 1,7 kb de pB1.7, tal como se describe en la Figura 3. Los fragmentos BamHI de 5,5 y 1,7 kb fueron mapeados en detalle.

15 Un fragmento XbaI-XbaI de 2,1 kb correspondiente al extremo derecho del plásmido pB5.5 fue subclonado en el plásmido pBluescript SK+, creándose el plásmido pBSGh. Más específicamente, este fragmento XbaI-XbaI de 2,1 kb se obtuvo por digestión del pB5.5 en un 20 sitio XbaI de corte interno, y por digestión en un segundo sitio de corte en el polilinker de pBSKS+ (y muy cercano al sitio de corte BamHI que se muestra en la Fig. 3).

25 Una región de 2570 nt fue secuenciada en ambas hebras. Esta región contenía la ORF1 (1380 pb), la cual comenzaba en un ATG localizado 740 pb empezando a contar a partir del extremo izquierdo del inserto en pBSGh, y se extendía hasta el final del fragmento 30 BamHI de 5,5 kb, con 60 pares de bases adicionales en el fragmento de 1,7 kb adyacente. La secuencia ORF1 estaba precedida por una región de 740 nucleótidos que contenía las secuencias necesarias para el inicio y regulación de la transcripción (ver SEQ ID No 1). 35 ORF1 contenía dos intrones putativos en posiciones

785-850 y 1414-1471 (según la numeración en SEQ ID No 1), los cuales mostraban estructuras lariat y secuencias de procesamiento 5' y 3' similares a las que se encuentran en otros intrones fúngicos (D.J. 5 Ballance, Yeast 1986, vol. 2, pp. 229-236). La presencia de dos intrones fue confirmada mediante secuenciación de las regiones de ADN correspondientes a los intrones obtenidas mediante PCR de una genoteca de ADNc de A. awamori, utilizando como "primers" los 10 oligonucleótidos IA y IB para el intrón I, y IIA y IIB para el intrón II.

El ADNc para estos experimentos se obtuvo a partir de ARN extraído tal como se describe en otras secciones, 15 a partir de micelio que fue crecido durante 48 horas en medio MDFA. La primera y segunda hebra del ADNc fueron sintetizados utilizando un kit de síntesis de ADNc de Stratagene (La Jolla, Ca). Este ADNc fue utilizado para realizar ciclos de amplificación 20 mediante PCR, amplificándose los fragmentos que contenían las uniones exón-exón utilizando el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, 50°C durante 1 min, 72°C durante 1 min seguido de 30 ciclos aa 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min, 72°C 25 durante 1 min y finalmente un ciclo a 72°C durante 8 min.

Oligonucleótidos:

30 IA 5' ATG TCT AAC CTT CCT CAC 3'
IB 5' ACC CTT ACC ACC ACC CAT 3'
IIA 5' CGC TTC TGT GTT TCC TTC 3'
IIB 5' GTA CTT GAA CTT GTT GGC 3'

A.2.1.2. ORF1 putativamente codifica a una glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente

ORF1 codificaba a una proteína de 460 aminoácidos (ver SEQ ID No. 2). con un peso molecular deducido de 49,4 kDa, y un valor pI de 5,62. La comparación de la proteína codificada por ORF1 con otras proteínas presentes en la base de datos SWISS-PROT mostró que la proteína codificada por esta secuencia tiene una alta homología con las glutamato deshidrogenasas NADP-dependientes de A. nidulans (84.7% de los aminoácidos son idénticos), N. crassa (identidad del 74.4%), Saccharomyces cerevisiae (identidad del 66.5%) y Schwanniomyces occidentalis (identidad del 66.9%), tal como se muestra en la Figura 4. La homología es extensiva a todo lo largo de la secuencia de la proteína. Todas estas proteínas son glutamato deshidrogenasas NADP-dependientes que catalizan la reducción aminativa de alfa-cetoglutarato, en presencia de ATP, para formar L-glutamato. La proteína codificada por ORF1 contiene nueve motivos conservados cuando se la compara con otras glutamato deshidrogenasas provenientes de hongos y levaduras. Uno de los motivos conservados (aminoácidos 108-121)corresponde a una región implicada en el mecanismo catalítico del enzima. La secuencia consenso de esta región es [LIV]-X(2)-G-G-[SAG]-K-X-[GV]-X(3)-[DNS]-[PL] (PROSITE PS00074). El residuo lisina K¹¹⁴, localizado en la región rica en GGGK¹¹⁴GG corresponde a la lisina en el centro activo de Glu/Leu/Phe/Val (GLFV) deshidrogenasas. Por lo tanto, y siguiendo la nomenclatura estandarizada para estos casos, el gen que codifica a ORF1 fue denominado gdhA.

A.2.1.3. El gen clonado complementa mutantes gdhA de Aspergillus nidulans

Las cepas de A. nidulans A686 y A699 fueron 5 transformadas según un método conocido (M.M. Yelton et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, vol. 81, pp. 1470-4) con el plásmido pGDHaw (7,1 kb), el cual contiene el gen gdhA de A. awamori en un fragmento XbaI de 2570 pb. Este fragmento también contiene una 10 región promotora de 740 pb y 334 pb de DNA situado después de ORF1 (gen gdhA). El fragmento XbaI-XbaI de 2570 pb fue insertado en el sitio de restricción XbaI del vector fúngico p43gdh, el cual contiene un marcador de resistencia a la fleomicina bajo el 15 control del promotor del gen gdhA de A. awamori, tal como se muestra más adelante en este documento.

Siete transformantes provenientes de una transformación de A. nidulans A686 con el gen de la 20 gdhA de A. awamori, y quince transformantes de A. nidulans A699 fueron analizados en medio mínimo suplementado con concentraciones varias de sulfato amónico (10, 50 y 100 mM) como fuente de nitrógeno, y su crecimiento fue comparado al de las cepas de A. 25 nidulans silvestre. Como control, el crecimiento también se midió en medio con 10 mM ácido glutámico. Tal como se muestra en la Figura 5, las cepas no transformadas de A. nidulans mutantes A686 and A699 crecen muy pobemente en placas con 100 mM sulfato 30 amónico, mientras que tres transformantes escogidos de una manera aleatoria crecen muy bien en este medio. El crecimiento residual de los mutantes gdh A686 y 699 de A. nidulans en sulfato amónico como fuente de nitrógeno es algo conocido (J.R. Kinghorn, J.A. 35 Pateman, Heredity 1973, vol. 31, pp. 427) y es debido

a la presencia de una segunda actividad glutamato deshidrogenasa que permite un crecimiento parcial en estos mutantes.

5 A.2.1.4. Actividad glutamato deshidrogenasa en los mutantes

La actividad específica de glutamato deshidrogenasa (GDH) del tipo NADP-dependiente (nicotinamida adenina 10 dinucleótido fosfato) fue medida haciendo un seguimiento de la aminación reductiva del α -cetoglutarato en presencia de amonio y NADPH. Se expresa en unidades de actividad enzimática por mg de proteína. La velocidad inicial de la reacción fue 15 estimada a partir de los cambio en densidad óptica a 340 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2001. Una unidad de glutamato deshidrogenasa fue definida como la actividad que cataliza la oxidación de un nanomol de NADPH por minuto.

20 Para confirmar los resultados de complementación, la actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente fue medida en los mutantes gdhA de A. nidulans A686 y A699, y en tres transformantes escogidos al azar que 25 habían sido complementados con el gen gdhA de A. awamori. Los resultados se muestran en la Tabla 1, y mostraron con claridad que si bien la actividad glutamato deshidrogenasa en las capas A686 y A699 estaba claramente por debajo de los límites de 30 detección, esta misma actividad estaba presente en niveles significativos en transformantes que habían sido complementados con el gen gdhA de A. awamori, especialmente a las 24 y 48 horas de crecimiento. Algunos transformantes, como el A699-4, mostraron 35 niveles relativamente altos de actividad glutamato

deshidrogenasa, quizás debido a la integración de más de una copia del gen gdhA en el genoma de este transformante.

5

Tabla 1: Actividad glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente (U/mg de proteína), en los mutantes gdhA A686 y A699 de A. nidulans, y en tres transformantes de cada uno de estos mutantes con el gen gdhA de A. awamori.

cepa	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
A. Awamori	550	0	0
A686	0	0	0
A686-4	350	280	100
A686-6	340	200	80
A686-7	310	160	90
A699	0	0	0
A699-2	270	240	100
A699-3	410	420	400
A699-4	500	670	580

25 A.2.1.5. Caracterización de la región promotora del gen gdhA

Las secuencias de ADN localizadas más adelante del códon de iniciación de la traducción ATG fueron 30 analizadas, y revelaron la presencia de secuencias GTATA, CTATA y TCAATC en las posiciones -316, -61 y -17, respectivamente, con respecto al codón de iniciación de la traducción, y podrían corresponder a putativas cajas TATA y CAAT involucradas en la 35 regulación de la expresión de este gen (ver SEQ ID No

1).

La identificación del lugar de inicio de la transcripción fue llevada a cabo mediante un 5 experimento de extensión ("primer extension") con 2 µg de ARNm obtenidos a partir de micelio crecido durante 48h, tal como se muestra en la Figura 6.

El experimento de extensión utilizó como "primer" el 10 oligonucleótido "Pe" 5'-GGGGTTCTTCTGGAAGAGGGT-3' (el cual corresponde a la secuencia de nucleótidos localizada 70 pb dentro de la región codificante). La reacción de extensión detectó una sola banda (Fig. 8). El extremo 5' del ARNm corresponde a una timina (T) 15 localizada 86 pb adelante del codón iniciador ATG.

A.2.1.6. El gen gdhA se transcribe como un transcripto monocistrónico de 1,7 kb, y su expresión está regulada por nitrógeno.

20 Con el objetivo de realizar estudios de expresión se preparó ARN total de A. awamori (método SDS-fenol) a partir de micelio crecido durante 12, 24, 48, 60 o 72 h en medio MDFA con 55.5 mM glucosa y 10 mM sulfato 25 amónico como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. En el caso de los estudios realizados para evaluar la regulación de la expresión de este gen por diferentes fuentes de nitrógeno, el medio MDFA básico (sin sulfato amónico) fue suplementado con 30 ácido glutámico, L-glutamina, nitrito sódico, nitrato sódico y L-asparagina a concentraciones finales de 10 mM.

35 Para la realización del análisis de "Northern", ARN total (5 µg) fue resuelto en un gel de agarosa-

formaldehido al 1,2%. El gel fue transferido a una membrana de nylon (NYTRAN 0.45; Schleicher & Schuell). El ARN fue fijado mediante irradiación con rayos ultravioleta mediante una lámpara UV-Stratalinker 2400 5 Stratagene, La Jolla, Calif.).

Para los experimentos de "slot blotting", el ARN (5 μ g) fue inmobilizado en un filtro (NYTRAN 0.45) mediante la acción del vacío en un aparato Bio-Dot SF 10 Microfiltration (Slot Blotting, Bio-Rad). El ARN fue fijado mediante irradiación con rayos ultravioleta tal como se ha descrito anteriormente. Los filtros fueron pre-hibridados 3 h a 42°C en formamida al 50%, 5 x solución de Denhardt, 5 x SSPE, 0.1% SDS, 500 μ g de 15 ADN de esperma de salmón desnaturalizado por ml, e hibridados en el mismo tampón contenido 100 μ g de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por ml a 42°C durante 18 h, usando como sonda un fragmento de ADN (0,694 kb PvuII) interno al gen gdhA de A. awamori. 20 Los filtros fueron lavados una vez en 2 x SSC, 0.1% SDS a 42°C durante 15 min, una vez en 0.1 x SSC, 0.1% SDS a 42°C durante 15 min, y una vez más en 0.1 x SSC, 0.1% SDS a 55°C durante 20 min. Finalmente se llevó a cabo autoradiografía con película de rayos -X de 25 Amersham. ARNm fue purificado a partir de ARN total utilizando un kit de aislamiento "Poly(A) Quick" (Stratagene, La Jolla, Calif.).

El análisis de "Northern" de la transcripción del gen 30 gdhA reveló que está fuertemente expresado como un transcripto (ARNm) de 1,7 kb, con un tamaño ligeramente superior al ARNm del gen de la β -actina, tal como se muestra en la Figura 7. Dado que ORF1 contiene 1380 nt, este tamaño de transcripto indica que el gen gdhA 35 se expresa como un transcripto monocistrónico.

Dado que en todos los carriles de la Fig. 7 se cargó la misma cantidad de ARN total, la conclusión es que los niveles de ARNm del gen gdhA en la célula son más altos que los del gen de la β -actina (flechas), lo 5 cual indica que el promotor de la glutamato deshidrogenasa es altamente eficiente.

Con el objetivo de determinar el perfil de expresión del gen gdhA durante el curso del crecimiento de A. awamori, se comparó la intensidad de la señal de 10 hibridación a una sonda gdhA con la intensidad de hibridación a una sonda β -actina, en condiciones de crecimiento en medio MDFA con sulfato amónico (Figura 8A). La intensidad de estas señales fue 15 entonces expresada como una relación entre las CPMs en la banda que hibrida con la sonda gdhA y las CPMs en la banda que hibrida con la sonda β -actina (Figura 8B). Los resultados indican que la expresión de los dos genes (gdhA y β -actina) está 20 asociada al crecimiento de A. awamori, pero mientras que niveles de ARNm de la β -actina eran detectables en la célula hasta las 96 horas de crecimiento, los niveles de ARNm del glutamato deshidrogenasa se 25 reducían drásticamente después de 48 horas de iniciado el crecimiento.

La actividad enzimática del glutamato deshidrogenasa detectada cuando A. awamori crece en medio MDFA con 10 mM sulfato amónico como fuente de nitrógeno en 30 diferentes tiempos de cultivo aparece en la Fig. 8C. Se detecta un descenso espectacular de la actividad enzimática del glutamato deshidrogenasa entre 24 y 48 horas después de haberse iniciado el cultivo, lo cual 35 está en perfecta sincronía con los resultados mostrados en la Fig. 8B referentes a los niveles de

ARNm del gdhA en diferentes tiempos de cultivo.

El enzima glutamato deshidrogenasa tiene un papel central en la utilización de nitrógeno por parte de A. awamori. Por lo tanto también fue de interés estudiar la posible regulación de la expresión del gdhA por diferentes fuentes de nitrógeno. Tal como se muestra en la Figura 9, los niveles de ARNm del gdhA fueron muy altos cuando se utilizó como fuente de nitrógeno NH_4^+ o asparagina. El ácido glutámico inhibió la transcripción del gen del gdhA, mientras que niveles intermedios de expresión (normalizados con respecto al gen de la β -actina) fueron observados en medio que contenía como fuente de nitrógeno nitrato, glutamina o nitrito. Estos resultados indican que la glutamato deshidrogenasa NADP-dependiente está sujeta a una fuerte regulación por nitrógeno al nivel transcripcional.

La Tabla 2 muestra la actividad glutamato deshidrogenasa detectada en cultivos de 24 horas crecidos en medio MDFA con diferentes fuentes de nitrógeno, todas ellas en concentraciones de 10 mM. La actividad más elevada (por ml de cultivo) fue detectada en cultivos que utilizaban como fuente de nitrógeno NH_4^+ o asparagina. Además, estas dos fuentes de nitrógeno favorecían crecimientos rápidos de A. awamori. Cuando los resultados se expresaron por unidad de proteína presente en los extractos celulares, la actividad específica más alta se detectó en medio MDFA con nitrato como única fuente de nitrógeno. Esto es debido a que en presencia de nitrato, A. awamori crece muy lentamente. La actividad más baja se observó en medio MDFA con glutamato como fuente de nitrógeno, confirmando los resultados

obtenidos anteriormente al nivel de la transcripción.

5 Tabla 2: Actividad glutamato deshidrogenasa NADP-
dependiente en cultivos de *A. awamori* crecidos
durante 24 horas en medio MDFA suplementado con
diferentes fuentes de nitrógeno.

	Fuente nitrógeno (10mM)	Act. total (U/ml)	Act. específica (U/mg proteína)
10	-----	-----	-----
	Amonio	1450	800
	Acido glutámico	330	280
	glutamina	1100	600
15	nitrito	990	660
	nitrato	1150	1680
	asparagina	1300	720

20 A.2.2. Construcción del cassette de expresión GDHTh

Una vez fue localizada la región del promotor del gen gdhA, se construyó un cassette de expresión de taumatinina similar al que se ha descrito anteriormente.

25 El plásmido pBSGh se usó como molde para obtener un fragmento de ADN de 750 pb correspondiente a la región promotora del gen gdhA. Este fragmento se obtuvo por amplificación de ADN utilizando los oligonucleótidos gdh1 y gdh2 y el enzima Pfu (Stratagene).

30

gdh1: 5' - TTTT GTCGAC TTG CGA CGG CGT ATT GCT - 3'
 Sal I

35

gdh2: 5' - TTTT CCATGG TCT GAA GGG GAG GAT TGA - 3'
 Nco I

Este fragmento de ADN amplificado se digerío con SalI y NcoI y se purificó en un gel de agarosa al 0,8%.

El plásmido pJL43 (un derivado del pJL43b, Dr. José Luis Barredo, tesis doctoral, Universidad de León, León, España) fue digerido con SalI y NcoI y se purificó en un gel de agarosa al 0,8% un fragmento de gran tamaño(3740 pb). Este fragmento de DNA fue entonces ligado con el fragmento SalI-NcoI previamente amplificado, dando lugar al plásmido p43gdh (4500 pb), donde el promotor pcbC de Penicillium chrysogenum ha sido sustituido por el promotor gdhA de Aspergillus niger, var. awamori.

En la siguiente etapa, el plásmido p43gdh fue digerido con NcoI, procesado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y luego con fosfatasa intestinal de ternera (CIP). Paralelamente, se amplificó mediante la técnica de PCR un fragmento de 1140 pb conteniendo el gen de la proteína B2, utilizando el plásmido pJE1A como molde y los oligonucleótidos NTB2b y CTB2b como "primers". Este fragmento de 1140 pb fue digerido con BamHI y luego tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. De esta mezcla de reacción se purificó en un gel de agarosa al 1,0 %, un fragmento de ADN de 425 pb que contiene las secuencias del extremo amino del gen B2. Este fragmento de ADN se unió, mediante una ligación de extremos romos, al fragmento de ADN del p43gdh anteriormente descrito, dando lugar al plásmido p43gdhB2, donde el corte BamHI que se muestra en la Figura 10 ha sido regenerado. Este plásmido tiene un tamaño de 4925 pb y contiene el promotor gdhA fusionado "en fase" al extremo amino terminal del gen B2.

El siguiente paso para la construcción del cassette completo de expresión fue la adición del segundo fragmento del gen B2, la secuencia KEX2 y el gen sintético de la taumatina II. Para esta parte del 5 trabajo se utilizó el plásmido pB2KEX.

El pB2KEX fue digerido con XbaI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y finalmente digerido con BamHI. Se purificó de un gel de agarosa 10 al 0,8 % un fragmento de 4637 pb. De la misma manera, el plásmido p43gdhB2 fue digerido con SalI, tratado con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I y finalmente digerido con BamHI. Se purificó de un gel de agarosa al 0,8 % un fragmento de 1173 pb. La 15 ligación de estos dos fragmentos dió lugar al plásmido pGDHTh (5810 pb), en el que se creó un nuevo sitio de restricción SalI. Esto permite que pueda obtenerse el cassette GDHTh completo como un fragmento SalI-SalI de 2170 pb.

20 Empezando con el plásmido pGDHTh, se construyeron dos nuevos plásmidos. El primero fue el p43GDTh, construido de la siguiente forma. El plásmido pJL43 se linearizó por digestión con SalI y se ligó al fragmento SalI-DraI de 2170 pb del pGDHTh (ver Fig.10, parte B). 25

30 Semejantemente, el plásmido pGD71 se construyó como sigue: el plásmido pAN7-1 (P.J. Punt et al., J. Biotechnol. 1990, vol. 17, pp. 19-34) fue digerido con XbaI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, y finalmente digerido con HindIII, purificándose de un gel de agarosa al 0,8%. De la misma manera, el plásmido pGDHTh se digirió con Ecl136II (o SacI*, una variante de SacI de Fermentas que 35 reconoce el sitio de restricción estándar de SacI pero

que deja extremos romos), HindIII y DraI. Se purificó de un gel de agarosa un fragmento de 2175 pb. La ligación de estos dos fragmentos dió lugar al plásmido pGD71 (ver Fig. 10, parte C).

5

Los plásmidos p43GDTh y pGD71 contienen un cassette para expresar taumatina que se compone de: (i) una secuencia de DNA la cual codifica una proteína de fusión formada por (a) el gen sintético de la taumatina II, (b) una secuencia "spacer" que contiene una secuencia de procesamiento KEX2, y (c) una secuencia de cDNA que codifica la mayor parte de la proteína B2 (excepto secuencias en el extremo COOH) de Acremonium chrysogenum; (ii) la secuencia señal del gen B2 de Acremonium chrysogenum, (iii) la región promotora del gen glutamato deshidrogenasa de Aspergillus niger, var. awamori, y (iv) un gen de resistencia a una droga que puede utilizarse como marcador de transformación. El plásmido p43GDTh tiene el gen de resistencia a la fleomicina (fleo) bajo el control del promotor pcbC de Penicillium chrysogenum. El plásmido pGD71 contiene el gen de resistencia a la higromicina B bajo el control del promotor del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa de Aspergillus nidulans.

A.3. Construcción del cassette de expresión GPDTh

El cassette de expresión GPDTh es similar al cassette de expresión B2KEX, excepto que el promotor B2 de Acremonium chrysogenum ha sido sustituido por el promotor del gen del gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (nombrado desde este momento "gpd") de Aspergillus nidulans.

La región promotora completa del gen gpd está presente en el plásmido pAN52-1 (P.J. Pat et al., J. Bioteecnol. 1990, vol. 17, pp. 19-34). Se ha subclonado un fragmento SacI-NcoI (880 pb) de pAN52-1, generando el 5 pJL43b1.

El plásmido pJL43b1 fue digerido primero con NcoI, fue tratado luego con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posteriormente con fosfatasa intestinal 10 de ternera (CIP), como se muestra en la Figura 11. De la misma manera, se obtuvo un fragmento de ADN de 1140 pb por amplificación de ADN empleando la técnica de la PCR, y utilizando el pJE1A como molde y los oligonucleótidos NTB2b y CTB2b como "primers". Este 15 fragmento de ADN fue digerido con BamHI y procesado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, dando lugar a un fragmento de 425 pb que fue purificado en un gel de agarosa al 0,8%. La ligación final dió lugar al plásmido pb1B2 (ver Fig. 11).

20

NTB2b: 5' - ATG CGT GCT GCT ACT CTC - 3'

CTB2b: 5' - CTG GCC GTT GTT GAT GAG - 3'

25

Como anteriormente se hizo con el cassette GDHTh, el paso siguiente en la construcción de un cassette completo de expresión fue la adición de la segunda porción del gen B2, la secuencia KEX2 y el gen sintético de la taumatinina II. Para esta parte del trabajo, se utilizó de nuevo el plásmido pB2KEX.

30

El pB2KEX fue digerido secuencialmente con XbaI, se trató con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I y finalmente fue digerido con BamHI. Se purificó un fragmento de 4637 pb de un gel de agarosa al 0,8%. De 35 la misma manera, el plásmido pb1B2 fue secuencialmente

digerido con BamHI y Ecl36II(o SacI*) (dejando extremos romos), y se purificó un fragmento de 1300 pb de un gel de agarosa de al 0,8%. La ligación de estos dos fragmentos dió lugar al plásmido pGPDTh (5800 pb).

5

En la siguiente etapa, se aisló el cassette GPDTh del pGPDTh por digestión con Ecl36II(o SacI*)-HindIII y DraI, obteniéndose un fragmento de ADN de 2800 pb. De la misma manera, el plásmido pB2KThb1 fue 10 secuencialmente digerido con BamHI, tratado con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y finalmente digerido con HindIII. Se aisló un fragmento de 4500 pb de un gel de agarosa al 0,8%. El plásmido resultante de la ligación de estos dos fragmentos fue nombrado 15 pGPThb1.

Este plásmido contiene un cassette para la expresión de taumatina que es idéntico al cassette de expresión B2KEX excepto en el promotor del gen B2 de Acremonium chrysogenum que ha sido reemplazado por el promotor del gen gpdA de Aspergillus nidulans.

B. Cepas empleadas y protocolos de transformación

25 La cepa de Aspergillus niger, var. awamori NRRL312 se obtuvo de la Colección de Cultivos tipo Americana (ATCC). Utilizando técnicas estándar de mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG), se obtuvo un derivado de esta cepa, que se llamó LpR66. Esta cepa mutante 30 secreta al medio de cultivo una exoproteasa inactiva aspergillopepsina A (nombrada desde este momento "pepA"). En todos los experimentos de transformación que se describen a continuación la cepa utilizada fue la cepa Aspergillus niger, var. awamori LpR66.

Los tres cassettes de expresión anteriormente descritos se emplearon para transformar la cepa Aspergillus niger, var. awamori LpR66.

5 En todos los experimentos de transformación simples, se usó el antibiótico fleomicina como marcador de selección. La cepa LpR66 puede crecer en placas que contienen 20 µg/ml de fleomicina. Por lo tanto, todos los transformantes se seleccionaron en placas con 25

10 µg/ml del antibiótico. El medio de regeneración que se utilizó es el TSAS, el cual contiene 30 g/l de Triptona-Soja (Difco), 103 g/l de sacarosa (Difco) y 1,5% agar (Difco).

15 El protocolo de transformación fue similar al descrito por Yelton (referenciado con anterioridad) con algunas modificaciones. Se inoculó una placa conteniendo medio "Power" con 10^7 esporas. Esta placa se incubó durante 72 horas a 30°C. Pasado este tiempo las esporas se

20 rasparon de la placa y se inocularon en 100 ml de medio CM (matraz de Erlermeyer de 500 ml). La incubación fue durante 16-18 horas a 250 rpm y 28°C. El micelio obtenido de este crecimiento se filtró a través de un filtro de nylon de 30 µm (Nytal) y se

25 lavó con tampón fosfato sódico 10 mM (pH 5.8), el cual también contenía sulfato magnésico al 0,6 M. Un gramo de micelio se re-suspendió en "tampón de protoplastos" (tampón fosfato sódico 10 mM (pH 5.8) y sulfato magnésico 1,2 M). Se añadió un volumen igual de tampón

30 contenido el enzima "Lysing" (Sigma), para dar una concentración final de 3 mg/ml de enzima. La solución de micelio se dejó incubar durante 3-4 horas a 100 rpm y 30°C hasta la formación de protoplastos. Esta formación se monitorizó por visualización al

35 microscopio. Los protoplastos se filtraron, lavaron y

finalmente se resuspendieron en solución de STC, hasta una concentración final de 10^8 protoplastos/ml.

Se mezclaron 100 μ l de solución de protoplastos con

5 10-20 μ g de DNA y se mantuvo en hielo durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se añadieron 500 μ l de PTC, y la mezcla se dejó a temperatura ambiente otros 20 minutos. Entonces se añadieron 600 μ l de medio STC y la mezcla de transformación se alicuotó en

10 diferentes tubos. Finalmente, se añadió la solución de antibiótico de fleomicina y el medio TSAS que contiene agar. El contenido de los tubos se homogeneizó suavemente y se vertió a las placas de TSAS conteniendo fleomicina. Las placas se incubaron a 30°C hasta la

15 visualización de transformantes como colonias individuales. En los casos que se utilizó higromicina B como marcador de selección el procedimiento fue análogo.

20 La linearización de todos los plásmidos que se han descrito dió como resultado un aumento en la eficiencia de la transformación del orden de 4 veces comparado con las transformaciones realizadas con los plásmidos sin linearizar. Por lo tanto en la mayoría

25 de los experimentos de transformación se usaron plásmidos linearizados.

Se obtuvieron y analizaron varios transformantes. Las selecciones iniciales se realizaron en placas

30 conteniendo 25 μ g/ml de fleomicina. La confirmación de los transformantes seleccionados se hizo utilizando concentraciones de fleomicina de hasta 200 μ g/ml.

Los transformantes se analizaron por PCR para detectar

35 si el gen de la taumatinina II se había incorporado al

genoma esencialmente como está descrito (cf. EP 684.312). Posteriormente aquellos transformantes que dieron positivo se analizaron para la expresión de taumatinina mediante análisis de inmunoblot y ELISA (enzyme-linked immunoassay) también como está descrito (cf. EP 684.312).

C: Cepas recombinantes productoras de taumatinina

10 C.1. Materiales y métodos

C.1.1. Medio de cultivo

15 Medio CM: extracto de malta, 5 g/l; extracto de levadura, 5 g/l; glucosa, 5 g/l.

20 Medio SMM: 8% citrato sódico; 1,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,13% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1% Tween 80; 0,1% uridina, 0,1% antiespumante AF y 7% leche de soja. La fuente de carbono (glucosa, sacarosa, maltosa, etc.) se encuentra en una concentración final del 15%. El pH del medio se ajusta a 6,2 con H_2SO_4 .

25 Medio MDFA: 1,2% L-asparagina; 0,8% solución de sales I [2% $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]; y 14,4% de solución de sales II [10,4% K_2HPO_4 ; 10,2% KH_2PO_4 ; 1,15% $\text{Na}_2\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,2% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,02% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,005% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,05% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$]. La fuente de carbono utilizada fue bien maltosa (generalmente al 6,5%) o bien un mezcla de sacarosa (3,6%) y glucosa (2,7%). Otras cantidades de fuente de carbono se indican en cada experimento que se describe. El pH inicial de este medio es 6,5.

C.1.2. Análisis de la fermentación

Los estudios de crecimiento y expresión se realizaron en medios SMM y MDFA, primero en matraces de

5 Erlermeyer, y después en varios fermentadores equipados con sistemas de medida y control para el seguimiento de las variables: agitación, oxígeno disuelto, pH, antiespumante y nivel de cultivo.

10 Los experimentos se hicieron en matraces de 1 litro con un volumen de trabajo de 150 ml. Se inoculó a una concentración final de 3×10^5 esporas/ml. La agitación fue de 150 rpm, y la temperatura de incubación fue de 30°C. El medio utilizado fue SMM o

15 MDFA.

Los experimentos realizados en fermentador fueron análogos a los realizados en matraz de Erlermeyer, excepto que el pH del medio se mantuvo constante a un

20 valor predeterminado, ajustándose por la adición automática de 30% NaOH o 0,5N H₂SO₄.

C.1.3. Métodos analíticos

25 Se tomaron muestras de 2-10 ml del cultivo de fermentación a diferentes tiempos y se procesaron para determinar el peso seco, la concentración de taumatina, maltosa y glucosa presentes.

30 El peso seco se determinó pasando una muestra a través de un pre-filtro (Nucleopore, Cat.No. 211114). El material biológico retenido en el pre-filtro se lavó con 40 ml de etanol puro y 50 ml de agua destilada. Posteriormente fue incubado a 90°C hasta peso

35 constante. El filtrado se alicuotó y congeló para los

subsiguentes análisis.

La concentración de taumatina en el caldo de cultivo se determinó por el método del "enzyme-linked immunoassay" (ELISA) y por "inmunoblotting" (Western blot), esencialmente como está descrito (cf. EP 684.312), utilizando un anticuerpo policlonal anti-taumatina. Para el "inmunoblotting", a veces las muestras se concentraron de la siguiente forma: se mezclaron 500 μ l de filtrado con un volumen igual de ácido tricloroacético al 10% (TCA), y se congelaron durante 12 h. Entonces la muestra se llevó a temperatura ambiente y se centrifugó en una centrifugadora de sobremesa (15,000 rpm; 20 min. 4°C). El precipitado que se recupera contiene todas las proteínas presentes en la muestra. Finalmente, este precipitado fue resuspendido en un tampón de carga para proteínas, hervido durante 5 minutos, y cargado en un gel SDS-PAGE tal como está descrito (cf. EP 684.312).

Aproximadamente 1 ml de filtrado se usó para la determinación de glucosa y maltosa. Los niveles de glucosa se determinaron utilizando un kit de SIGMA 25 DIAGNOSTICS (Procedure number 510).

La concentración de maltosa en el caldo de cultivo se determinó del siguiente modo: se pusieron 250 μ l de muestra filtrada en un tubo previamente enfriado; se añadieron entonces 1,250 ml. de solución de antrona (preparada disolviendo 2 g de antrona en 50 ml de etanol absoluto y añadiendo 950 ml de 75% H_2SO_4), y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, la muestra se transfirió a un baño de agua hirviendo, y se incubó durante 10 minutos. Finalmente

las muestras se enfriaron de nuevo y se leyó la absorbancia a 625 nm. La concentración de maltosa se determinó por comparación con una curva de calibración calculada midiendo la absorbancia de soluciones de maltosa de concentraciones conocidas (rango: 0 - 0.2 g/l).

C.2. Cepas productoras de taumatinina

10 C.2.1. Cepa TB2b1-44

Esta cepa es una derivada de la Lpr66 que fue obtenida por transformación de LpR66 con el plásmido de expresión pB2KTh-b1. Este cassette de expresión 15 contiene el gen sintético de la taumatinina II bajo el control del promotor de la proteína B2 de Acremonium chrysogenum. En matraces de Erlermeyer con medio MDFA esta cepa secreta 6-8 mg taumatinina/l.

20 Los estudios para su optimización se llevaron a cabo en un fermentador de 5-litros New Brunswick. El inóculo se obtuvo haciendo crecer la cepa durante 40 horas a 30°C en medio CM.. De este inóculo se usaron 450 ml para sembrar el fermentador de 5 litros 25 (volumen de trabajo 4.5 litros). Las RPMs se variaron entre 250 y 500, en función del estado de oxígeno del sistema.

30 Se probaron diferentes parámetros, tales como el pH del medio y las fuentes de carbono y nitrógeno. Experimentos representativos se describen en la Figura 12.

35 (1) Crecimiento en medio MDFA a un 6,0 % de sacarosa y L-asparagina como fuente de nitrógeno. El set-point

del pH se estableció a 6,2, y un se instaló un sistema de "fed-batch". Las adiciones se realizaron a las 36, 48, 60 y 72 horas después del comienzo de la fermentación. En cada adición se introdujeron 45 ml de 5 solución de sacarosa a 0,5 g/ml.

(2) Las condiciones fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior, excepto que la L-asparagina fue reemplazada por sulfato amónico 10 (conservándose las cantidades molares para ambos experimentos) como fuente de nitrógeno.

La mejor productividad se obtuvo bajo las condiciones descritas en el apartado 1, con asparagina como 15 fuente de nitrógeno, y con 6% de sacarosa como fuente de carbono, con 4 adiciones de sacarosa cada 12 h después de 36 h de fermentación. Bajo estas condiciones, se obtuvieron producciones de 100 mg taumatina/l.

20

C.2.2. Cepa TGDTh-4

Esta cepa, se depositó según el Tratado de Budapest con fecha 25 de marzo de 1998 (25.03.98) y con número 25 de acceso CECT20241, en la siguiente institución:

30 Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)
Edificio de Investigación, planta baja, no. 34
Universidad de Valencia
Campus de Burjasot
46100 Valencia, España.

35 Se trata de un derivado de la Lpr66 obtenido por transformación de LpR66 con el cassette de expresión p43GDTh. Este cassette de expresión contiene el gen

sintético de la taumatinina II bajo el control del promotor del gen gdhA de Aspergillus niger, var. awamori. En matraces de Erlermeyer con medio MDFA (con 6,0% de sacarosa) esta cepa secreta 6-8 mg.

5 taumatinina/l.

También se realizaron experimentos bajo condiciones controladas en un fermentador de 5-litros New Brunswick, como se ha descrito anteriormente para cepa 10 TB2b1-44. Se utilizó sulfato amónico en lugar de asparagina como fuente de nitrógeno, empleándose la misma relación molar. En este experimento, mostrado también en la Figura 12, se probaron las siguientes 15 condiciones: la cepa TGDTh-4 se hizo crecer en medio MDFA suplementado con 6% de sacarosa y sulfato amónico como fuente de nitrógeno. El set-point de PH se estableció a 6,2 y se instaló también un sistema de "fed-batch". Las adiciones se hicieron a las 36, 48, 60 y 72 h después del inicio de la fermentación. En 20 cada adición se introdujeron 45 ml de solución de sacarosa a 0,5 g/ml.

Los resultados (Fig. 12) indican que la producción de taumatinina es también del orden de 100 mg/l, con la 25 ventaja adicional de una producción más temprana y el uso de una fuente de nitrógeno más económica. Por lo tanto, el promotor del glutamato deshidrogenasa de Aspergillus niger, var. awamori se revela más eficiente que el promotor de la proteína B2 de 30 Acremonium chrysogenum.

C.2.3. Cepa TGP-3

Esta cepa es un derivado de la cepa Lpr66 obtenido por 35 transformación de LpR66 con el cassette de expresión

5 pGPTb1. Este cassette de expresión contiene el gen sintético de la taumatina II bajo el control del promotor del gen gpd de Aspergillus niger, var. awamori. En matraces de Erlermeyer con medio MDFA esta cepa secreta 9-10 mg. taumatina/litro.

C.2.4. Transformantes dobles

10 Las cepas TB2b1-44 y TGP-3 fueron re-transformadas con el plásmido de expresión pGD71, el cual contiene el gen de la taumatina bajo el control del promotor del glutamato deshidrogenasa de A. Awamori y un gen de resistencia a la higromicina B como marcador de selección para experimentos de transformación. Se 15 analizaron en experimentos realizados en matraz de Erlermeyer un conjunto de diferentes transformantes (ver Tabla 3). Se vió que la re-transformación de la cepa TGP-3 no dió cepas con mejores produjctividades de taumatina. Sin embargo, la 20 re-transformacióbn de la TB2b1-44 dió cepas de producción mejorada cuando se cultivaron en matraces de Erlermeyer bajo las conditions estándar anteriormente mencionadas.

25 D: Purificación de la taumatina recombinante

30 Se emplearon dos procedimientos para la purificación de la taumatina recombinante. En el primero el caldo de fermentación fue simplemente clarificado, concentrado y diafiltrado, dando un extracto 35 concentrado y limpio que se utilizó para experimentos de sensitividad para asegurar el perfil dulce de la taumatina recombinante. El segundo procedimiento involucra un protocolo clásico de purificación, con el resultado final de la obtención de taumatina pura.

Tabla 3: Producción de taumatinina en matraz de
 Erlermeyer por cepas retransformadas crecidas en medio
 5 MDFA durante 96 h. Cuantificación por ELISA. Todas las
 cepas se retransformaron utilizando la resistencia a
 la higromicina B como marcador de selección.

	Transformante	Producción (mg/l)	Cepa original
10	-----	-----	-----
	TGP3-GD1	2.08	TGP3
	TGP3-GD2	0.40	TGP3
	TGP3-GD3	9.44	TGP3
	TGP3-GD4	8.25	TGP3
15	TGP3-GD5	0.40	TGP3
	TGP3-GD6	9.71	TGP3
	TB2b1-44-GD1	3.84	TB2b1-44
	TB2b1-44-GD2	0.00	TB2b1-44
	TB2b1-44-GD3	9.85	TB2b1-44
20	TB2b1-44-GD4	11.10	TB2b1-44
	TB2b1-44-GD5	11.82	TB2b1-44
	TB2b1-44-GD6	10.75	TB2b1-44
	TB2b1-44-GD7	10.52	TB2b1-44
	TB2b1-44-GD8	8.09	TB2b1-44
25	TB2b1-44-GD9	7.13	TB2b1-44
	-----	-----	-----

D.1. Clarificación, concentración y diafiltración de
los caldos de fermentación

30 La biomasa se eliminó mediante filtración a través de
 papel de filtro. El filtrado se recogió en un matraz
 Kitasatos que estaba sumergido en hielo. El caldo
 clarificado se centrifugó a 6000 rpm durante 15
 35 minutos a 4°C.

El caldo de fermentación clarificado se concentró mediante ultrafiltración con un Sistema de Filtración Tangencial ProFluxTM M12 . La configuración del sistema fue: unidad base, sensor de nivel, depósito de 2,5 l, serpentín de refrigeración, transductores de presión de salida y entrada, bomba secundaria y un cartucho en espiral S1Y3 (3.000 Daltons de tamaño de exclusión).

10

El sistema se operó como sigue:(1)Calibración de sensores de presión. (2) Ajuste de los valores de consigna de alarma: Límite inferior (entrada) 3,0 Bars, límite superior (entrada) 3,5 Bars, diferencia de presión (entrada-salida) 0,3 Bars. (3) Lavado del sistema y del cartucho con agua desionizada. (4) Llenado del depósito con la solución a procesar; dicha solución se mantiene a 8-10°C recirculando agua fría (HAAKE,Criostato DC1-K20) por el serpentín de refrigeración. (5) Ajuste del sensor de nivel al volumen de concentración deseado (1/4 - 1/5 del volumen inicial). (6) Operar con la bomba de recirculación al 75%. (7) Ajuste de la válvula reguladora de presión hasta obtener 3,0 Bar de presión de entrada. Si era necesario, se reducía la presión durante el procesamiento.

Una vez el caldo de fermentación se concentró al volumen deseado, la solución se diafiltró con el objetivo de eliminar los solutos de bajo peso molecular (Sales, azúcares, etc.).

La configuración del sistema permite operar en modo de "diafiltración por bombeo con parada automática de seguridad". La bomba secundaria, accionada por el

sensor de nivel transfiere la solución de dialización (5 volúmenes de agua desionizada) al depósito, manteniendo el volumen constante. Una vez agotada la solución de diafiltración la bomba secundaria y el 5 sistema principal se paran automáticamente.

La solución diafiltrada se recogió del sistema, se esterilizó por filtración (Stericup, 0.22 μm , Millipore) y se almacenó a 4°C.

10

D.2. Purificación de la taumatina recombinante hasta homogeneidad

La taumatina recombinante se purificó hasta 15 homogeneidad usando un procedimiento de purificación en cuatro pasos que se detalla en la Tabla 4. El punto de partida de este protocolo de purificación que aquí se describe son 500 ml de caldo de fermentación, obtenidos del crecimiento de la cepa TGDTh-4, con una 20 concentración de taumatina presente de 50 mg/l.

Las proteínas de este caldo se precipitaron con sulfato amónico (rango 20-50%). El precipitado fue entonces resuspendido en un tampón fosfato 25 mM, pH 25 7.0.

Esta mezcla se pasó a través de una columna Sephadex G-25 (para eliminar sales) y se eluyó con el mismo tampón. Finalmente la muestra se cargó en una columna 30 CM-Sepharose a un flujo de 0,5 ml/minuto. La columna se lavó con tampón fosfato 25 mM, pH 7. con el objetivo de eliminar las proteínas en la fracción de flujo circulante. La taumatina se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-400 mM). La taumatina que se eluye 35 de esta columna es prácticamente pura como se detecta

por tinción con "Coomassie Blue".

Tabla 4: Purificación de taumatina del caldo de fermentación del crecimiento de la cepa TGDTh-4 en
5 medio MDFA

	MUESTRA	VOLUMEN (ml)	CONC. (mg/l)	TOTAL (mg)	REND (%)
10	Caldo	500	50	25	100.0
	sulfato amónico	11	1745	19.2	76.8
	Sephadex G-25	30	596	17.9	71.6
	CM-Sepharose	24	704	16.9	67.6

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID 1. Secuencia de nucleótidos de 2570 pb del fragmento de DNA presente en el plásmido pBSGh, así como el extremo 5' del plásmido pB1.7, que contiene el gen gdhA de A. awamori. Los numeros de la derecha indican el número de la secuencia. La región promotora del gen gdhA de A. awamori precede al codón de iniciación ATG en la posición 741 en la secuencia. El inicio de la transcripción se encuentra en la posición T de -86 con respecto a la tripleta de iniciación de la traducción (posición 655 en la secuencia). La parte del gen que codifica a la proteína empieza en la posición 741. Los números debajo de los aminoácidos indican su numeración. Hay un total de 460 aminoácidos. El símbolo estrella (*) después del último aminoácido indica el final de proteína. Se describen también los dos exones que contiene.

20	TCTAGATTGC GACGGCGTAT TGCTTATCCT TAGTAGGACT CCCTAATGGA TTCCGAGCAA	60
	GAAAAGACTG TTTGGCGTGT ACCAATGGCT CATACTACCA GCAAGAGAAG AATTTCTCT	120
	CTCGCTTCGA GAAAGCAATC AAAAAAAAAT CCTATCCTAC CCTACCCCTAC CCTAATACTT	180
	CCATTGCCAC CCGATTCCCTC CCGATAGTAG AGCGGGCGAC TGCCATTG TGCGCGGGCC	240
	AGCGGATTCC CGCGATAGA TAACGGGCAG ATTCTGTGAC CTCAAACTAT CGACTAACAG	300
25	CCCGAACTTC GGCGGCCACC GCCAAACCCG CCCCCGAAGC CGGCCTCATT TGCGTTTGG	360
	GCGTGCCAGG AAATGCCGCC TGCAGCGGAG ACTCCCTAGT GTGGTCTGTG TTGCCTGTGT	420
	CGTCTGTGTA GTATACTAGT TACTAGTCTA CTACTGTACA GTGGATGGCC TGAGGGGGGG	480
	ACTTTATGTC CGACTCCGGC TGTTCTCCTC CCTCTATCCA CTCTACCCCTC TTCCCTCTCT	540
	TCTGTCTTTC TCCCCGCTCT CGCCCCCTCCC CTCCCTGAAA ACATAAAATCG GCCTTTCCCC	600
30	CTCGCCATCT TCTTCTCTT CTCCCTCTCC TTTCTCTTTC TTCTTCAGAC TACTTCTCTT	660
	TCTTTCATCT TTTCTCTATA TTCTGTGTTT CCTAGATAACC CCAGTTAAAA AAGTTCTCTC	720
	AATCAATCCT CCCCTTCAGA ATG TCT AAC CTT CCT CAC GAG CCC GAG TTC	770

Met Ser Asn Leu Pro His Glu Pro Glu Phe

1

5

10

EE-30-01 M

48

	GAG CAG GCC TAC AAG GGTATGTTCC ATTGCCCTC CGAAATTGAT GATGGAAAAA	825		
	Glu Gln Ala Tyr Lys			
	15			
5	AAATTCTAAC AACATCCTCT TACA GAG CTT GCC TCG ACC CTT GAG AAC TCC	876		
	Glu Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser			
	20			
10	ACC CTC TTC CAG AAG AAC CCC GAA TAC CGC AAG GCC CTT GCT GTC GTC	924		
	Thr Leu Phe Gln Lys Asn Pro Glu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Val Val			
	25	30	35	40
15	TCC GTC CCC GAG CGT GTC ATC CAG TTC CGT GTC GTC TGG GAG GAT GAT	972		
	Ser Val Pro Glu Arg Val Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp			
	45	50	55	
20	GCC GGC AAC GTC CAG GTC AAC CGC GGT TTC CGT GTC CAG TTC AAC AGC	1020		
	Ala Gly Asn Val Gln Val Asn Arg Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser			
	60	65	70	
25	GCC CTC GGT CCC TAC AAG GGT GGT CTT CGT TTC CAC CCC TCC GTC AAC	1068		
	Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn			
	75	80	85	
30	TTG TCC ATC CTC AAG TTC CTT GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCT	1116		
	Leu Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala			
	90	95	100	
35	CTC ACT GGC CTG AAC ATG GGT GGT AAG GGT GGT TCC GAC TTC GAC	1164		
	Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly Lys Gly Ser Asp Phe Asp			
	105	110	115	120
40	CCC AAG GGC AAG TCC GAC AAC GAG ATC CGT CGC TTC TGT GTT TCC TTC	1212		
	Pro Lys Gly Lys Ser Asp Asn Glu Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe			
	125	130	135	

10-06-99

49

ATG ACC GAG CTC TGC AAG CAC ATC GGT GCC GAC ACT GAT GTT CCC GCT 1260
Met Thr Glu Leu Cys Lys His Ile Gly Ala Asp Thr Asp Val Pro Ala
140 145 150

5
GGT GAC ATC GGT GTC ACC GGT CGT GAG GTC GGT TTC CTC TTC GGC CAG 1308
Gly Asp Ile Gly Val Thr Gly Arg Glu Val Gly Phe Leu Phe Gly Gln
155 160 165

10 TAC CGC AAG ATC CGC AAC CAG TGG GAG GGT GTT CTC ACC GGT AAG GGT 1356
Tyr Arg Lys Ile Arg Asn Gln Trp Glu Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly
170 175 180

GGC AGC TGG GGT GGT TCC CTC ATC CGC CCT GAG GCC ACC GGT TAC GGT 1404
15 Gly Ser Trp Gly Ser Leu Ile Arg Pro Glu Ala Thr Gly Tyr Gly
185 190 195 200

GTT GTC TAC GTATGTCAAT TCCTCTTCTT ATGATTATCT ATGTATAACA 1453
Val Val Tyr

20 GCGACTAACG CGTAACAG TAC GTC GAG CAC ATG ATT GCT CAC GCC ACC AAC 1504
Tyr Val Glu His Met Ile Ala His Ala Thr Asn
205 210

25 GGC CAG GAG TCC TTC AAG GGC AAG CGC GTT GCC ATC TCC GGT TCC GGT 1552
Gly Gln Glu Ser Phe Lys Gly Lys Arg Val Ala Ile Ser Gly Ser Gly
215 220 225 230

AAC GTT GCC CAG TAC GCC GCC CTC AAG GTC ATT GAG CTC GGC GGT TCC 1600
30 Asn Val Ala Gln Tyr Ala Ala Leu Lys Val Ile Glu Leu Gly Ser
235 240 245

GTC GTC TCC CTG AGC GAC ACG CAG GGC TCC CTC ATC ATC AAC GGC GAG 1648
Val Val Ser Leu Ser Asp Thr Gln Gly Ser Leu Ile Ile Asn Gly Glu
35 250 255 260

EE-30-01 M

50

	GGT AGC TTC ACC CCC GAG GAG ATC GAG CTC ATC GCT CAG ACC AAG GTC		1696
	Gly Ser Phe Thr Pro Glu Glu Ile Glu Leu Ile Ala Gln Thr Lys Val		
265	270	275	
5			
	GAG CGC AAC GAG CTC GCC AGC ATC GTC GGT GCT GCT CCC TTC AGC GAC		1744
	Glu Arg Asn Glu Leu Ala Ser Ile Val Gly Ala Ala Pro Phe Ser Asp		
280	285	290	
10	GCC AAC AAG TTC AAG TAC ATT GCT GGT GCC CGC CCC TGG GTT CAC GTC		1792
	Ala Asn Lys Phe Lys Tyr Ile Ala Gly Ala Arg Pro Trp Val His Val		
295	300	305	310
	GGC AAG GTC GAC GTC GCT CTC CCC TCC GCT ACC CAG AAC GAA GTT TCC		1840
15	Gly Lys Val Asp Val Ala Leu Pro Ser Ala Thr Gln Asn Glu Val Ser		
	315	320	325
	GGC GAG GAG GCC CAG GTC CTC ATC AAC GCT GGC TGC AAG TTC ATC GCC		1888
	Gly Glu Glu Ala Gln Val Leu Ile Asn Ala Gly Cys Lys Phe Ile Ala		
20	330	335	340
	GAG GGT TCC AAC ATG GGT TGC ACC CAG GAG GCC ATC GAC ACC TTC GAG		1936
	Glu Gly Ser Asn Met Gly Cys Thr Gln Glu Ala Ile Asp Thr Phe Glu		
	345	350	355
25			
	GCC CAC CGT ACC GCC AAC GCT GGC GCG GCT GCC ATC TGG TAC GCC CCC		1984
	Ala His Arg Thr Ala Asn Ala Gly Ala Ala Ala Ile Trp Tyr Ala Pro		
	360	365	370
30	GGT AAG GCC GCC AAC GCC GGT GGT GTC GCT GTC TCC GGT CTG GAG ATG		2032
	Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala Val Ser Gly Leu Glu Met		
	375	380	385
			390

35

M 10-06-99

51

	GCT CAG AAC TCT GCC CGC CTC AGC TGG ACT TCT GAG GAG GTT GAT GCC	2080	
	Ala Gln Asn Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr Ser Glu Glu Val Asp Ala		
	395	400	405
5	CGT CTT AAG GAC ATC ATG CGC GAC TGC TTC AAG AAC GGT CTT GAG ACT	2128	
	Arg Leu Lys Asp Ile Met Arg Asp Cys Phe Lys Asn Gly Leu Glu Thr		
	410	415	420
10	GCT CAG GAG TAC GCC ACC CCC GCT GAG GGT GTC CTG CCT TCC CTG GTG	2176	
	Ala Gln Glu Tyr Ala Thr Pro Ala Glu Gly Val Leu Pro Ser Leu Val		
	425	430	435
15	ACC GGA TCC AAC ATT GCC GGT TTC ACC AAG GTG GCT GCC GCC ATG AAG	2224	
	Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys Val Ala Ala Ala Met Lys		
	440	445	450
20	GAC CAG GGT GAC TGG TGG TAAATGCGGA AAGCCGAAA CCCCCGCGGC	2272	
	Asp Gln Gly Asp Trp Trp		
	455	460	
25	TTATGTCATG ACGATTATGT AGTTTGATGT TCCCTTCAG CGCGGATGGA TAGAGGCGCC	2332	
	GGTGTGTTCT TGCTAGTTA GATGGATGCA TAATGATATC CTTTTCTTAA TCCTCAAATT	2392	
	CTTGTAAATT GTTGTATCAA TAGTAGATAA TACAACGTGTA GTCAACTACC CTTGCATCTT	2452	
	CACTATTTGC AGATGCATTC ATCTCTATTG CGAGCACATG CACAAACCCA TGGGACCGCA	2512	
	2570		
30	GTTCACTAGT ACTTAGCCTG TTATCTTCCC TCTATCGCAT CTTAAACAAAC TATCTAGA		
35			

EE-30-01 M

52

SEQ ID 2. Secuencia de aminoácidos de la proteína glutamato deshidrogenasa A (gdhA) Aspergillus niger, var. awamori deducida de la secuencia de nucleótidos en SEQ ID 1.

5

	Met	Ser	Asn	Leu	Pro	His	Glu	Pro	Glu	Phe	Glu	Gln	Ala	Tyr	Lys	Glu
	1			5					10						15	
10	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Ser	Thr	Leu	Phe	Gln	Lys	Asn	Pro	Glu
				20					25					30		
	Tyr	Arg	Lys	Ala	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Val	Pro	Glu	Arg	Val	Ile	Gln
				35					40				45			
15	Phe	Arg	Val	Val	Trp	Glu	Asp	Asp	Ala	Gly	Asn	Val	Gln	Val	Asn	Arg
				50					55				60			
20	Gly	Phe	Arg	Val	Gln	Phe	Asn	Ser	Ala	Leu	Gly	Pro	Tyr	Lys	Gly	Gly
	65				70					75				80		
	Leu	Arg	Phe	His	Pro	Ser	Val	Asn	Leu	Ser	Ile	Leu	Lys	Phe	Leu	Gly
					85					90			95			
25	Phe	Glu	Gln	Ile	Phe	Lys	Asn	Ala	Leu	Thr	Gly	Leu	Asn	Met	Gly	Gly
					100					105			110			
	Gly	Lys	Gly	Gly	Ser	Asp	Phe	Asp	Pro	Lys	Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Glu
					115				120			125				
30	Ile	Arg	Arg	Phe	Cys	Val	Ser	Phe	Met	Thr	Glu	Leu	Cys	Lys	His	Ile
					130				135			140				
	Gly	Ala	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Ala	Gly	Asp	Ile	Gly	Val	Thr	Gly	Arg
35	145					150					155			160		

M 10-06-89

53

Glu Val Gly Phe Leu Phe Gly Gln Tyr Arg Lys Ile Arg Asn Gln Trp
165 170 175

5 Glu Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Ser Trp Gly Gly Ser Leu Ile
180 185 190

Arg Pro Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Val Val Tyr Tyr Val Glu His Met
195 200 205

10 Ile Ala His Ala Thr Asn Gly Gln Glu Ser Phe Lys Gly Lys Arg Val
210 215 220

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asn Val Ala Gln Tyr Ala Ala Leu Lys Val
15 225 230 235 240

Ile Glu Leu Gly Gly Ser Val Val Ser Leu Ser Asp Thr Gln Gly Ser
245 250 255

20 Leu Ile Ile Asn Gly Glu Gly Ser Phe Thr Pro Glu Glu Ile Glu Leu
260 265 270

Ile Ala Gln Thr Lys Val Glu Arg Asn Glu Leu Ala Ser Ile Val Gly
275 280 285

25 Ala Ala Pro Phe Ser Asp Ala Asn Lys Phe Lys Tyr Ile Ala Gly Ala
290 295 300

Arg Pro Trp Val His Val Gly Lys Val Asp Val Ala Leu Pro Ser Ala
30 305 310 315 320

Thr Gln Asn Glu Val Ser Gly Glu Glu Ala Gln Val Leu Ile Asn Ala
325 330 335

35

EE-30-01 M

54

Gly Cys Lys Phe Ile Ala Glu Gly Ser Asn Met Gly Cys Thr Gln Glu
340 345 350

Ala Ile Asp Thr Phe Glu Ala His Arg Thr Ala Asn Ala Gly Ala Ala
5 355 360 365

Ala Ile Trp Tyr Ala Pro Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala
370 375 380

10 Val Ser Gly Leu Glu Met Ala Gln Asn Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr
385 390 395 400

Ser Glu Glu Val Asp Ala Arg Leu Lys Asp Ile Met Arg Asp Cys Phe
405 410 415

15 Lys Asn Gly Leu Glu Thr Ala Gln Glu Tyr Ala Thr Pro Ala Glu Gly
420 425 430

20 Val Leu Pro Ser Leu Val Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys
435 440 445

Val Ala Ala Ala Met Lys Asp Gln Gly Asp Trp Trp
450 455 460

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

(i) APPLICANT:

- (A) NAME: URQUIMA, S.A.
- (B) STREET: Dega Bahi, 59-67
- (C) CITY: Barcelona
- (D) STATE: Barcelona
- (E) COUNTRY: Spain
- (F) POSTAL CODE (ZIP): 08026
- (G) TELEPHONE: 343-3471511
- (H) TELEFAX: 347-4560639
- (I) TELEX: 52.963URIAC E

(ii) TITLE OF INVENTION: Promotor and constructions for expression of recombinant proteins in filamentous fungi (Promotor y construcciones para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos)

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2

(iv) COMPUTER READABLE FORM:

- (A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:

- (A) LENGTH: 2570 base pairs
- (B) TYPE: nucleic acid
- (C) STRANDEDNESS: double
- (D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: DNA (genomic)

(iii) HYPOTHETICAL: NO

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

- (A) ORGANISM: Aspergillus awamori
- (B) STRAIN: ATCC 22342

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: intron
- (B) LOCATION: 785..850

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: intron
- (B) LOCATION: 1414..1471

(ix) FEATURE:

- (A) NAME/KEY: CDS
- (B) LOCATION: join(741..785, 850..1413, 1472..2242)

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 1:

TCTAGATTCG GACGGCGTAT TGCTTATCCT TAGTAGGACT CCCTAATGGA TTCCGAGCAA	60
AAAAAGACTG TTTGGCGTGT ACCAATGGCT CATAGTACCA GCAAGAGAAG AATTTCTCT	120
CTCGCTTCGA GAAAGCAATC AAAAAAAAT CCTATCCTAC CCTACCCCTAC CCTAATACTT	180
CCATTGCCAC CCGATTCTC CCGATAGTAG AGCGGGCGAC TGCCATTTGG CGGGCGGCC	240
AGCGGATTCC CGCCGATAGA TAACGGGCAG ATTCTGTGAC CTCAAACTAT CGACTAACAG	300
CCCGAACTTC GGCGGCCACC GCCAAACCG CCCCGGAAGC CGGCCTCATT TGCCGTTTGG	360
GCGTGCCAGG AAATGCCGCC TGCAGCGGAG ACTCCCTAGT GTGGTCTGTG TTGCCTGTGT	420
CGCTCTGTGA GTATACTAGT TACTAGTCTA CTACTGTACA GTGGATGGCC TGAGGGGGGG	480
ACTTTATGTC CGACTCCGGC TGTTCTCCTC CCTCTATCCA CTCTACCCCTC TTCCCTCTCT	540
TCTGTCTTTC TCCCCGCTCT CGCCCTCCCC CTCCCTGAAA ACATAAATCG GCCTTCCCC	600
CTCGCCATCT TCTTCTTCTT CTCCCTCTCC TTTCTCTTTC TTCTTCAGAC TACTTCTCTT	660
TCTTTCATCT TTTCTCTATA TTCCGTGTTT CCTAGATACC CCAGTTAAAA AAGTTCTCTC	720
AATCAATCCT CCCCTTCAGA ATG TCT AAC CTT CCT CAC GAG CCC GAG TTC	770
Met Ser Asn Leu Pro His Glu Pro Glu Phe	
1 5 10	
GAG CAG GCC TAC AAG GGTATGTTCC ATTGCCCTC CGAAATTGAT GATGGAAAAA	825
Glu Gln Ala Tyr Lys	
15	
AAATTCTAAC AACATCCTCT TACA GAG CTT GCC TCG ACC CTT GAG AAC TCC	876
Glu Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser	
20	
ACC CTC TTC CAG AAC CCC GAA TAC CGC AAG GCC CTT GCT GTC GTC	924
Thr Leu Phe Gln Lys Asn Pro Glu Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Val Val	
25 30 35 40	
TCC GTC CCC GAG CGT GTC ATC CAG TTC CGT GTC GTC TGG GAG GAT GAT	972
Ser Val Pro Glu Arg Val Ile Gln Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp	
45 50 55	
GCC GGC AAC GTC CAG GTC AAC CGC GGT TTC CGT GTC CAG TTC AAC AGC	1020
Ala Gly Asn Val Gln Val Asn Arg Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser	
60 65 70	
GCC CTC GGT CCC TAC AAG GGT GGT CTT CGT TTC CAC CCC TCC GTC AAC	1068
Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn	
75 80 85	
TTG TCC ATC CTC AAG TTC CTT GGT TTC GAG CAG ATC TTC AAG AAT GCT	1116
Leu Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala	
90 95 100	
CTC ACT GGC CTG AAC ATG GGT GGT AAG GGT GGT TCC GAC TTC GAC	1164
Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly Lys Gly Ser Asp Phe Asp	
105 110 115 120	
CCC AAG GGC AAG TCC GAC AAC GAG ATC CGT CGC TTC TGT GTT TCC TTC	1212
Pro Lys Gly Lys Ser Asp Asn Glu Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe	
125 130 135	
ATG ACC GAG CTC TGC AAG CAC ATC GGT GCC GAC ACT GAT GTT CCC GCT	1260
Met Thr Glu Leu Cys Lys His Ile Gly Ala Asp Thr Asp Val Pro Ala	
140 145 150	

M 10-06-99

57

GGT GAC ATC GGT TGC ACC GGT CTT TAG GTC GCT 170 TGC TTT GGC CAG Dly Asp Ile Gly Val Thr Gly Arg Glu Val Dly Phe Leu Phe Gly Glu 165 166	1308
TAC CGC AAG ATC CGC AAC CGG TGG TGG GGT TGT TGC ACC GGT AAG GGT Tyr Arg Lys Ile Arg Asn Glu Trp Glu Dly Val Leu Thr Dly Lys Gly 170 171 172	1356
GGC AGC TGG GGT CCT TCC CTC ATC CGC CCT GAG GGC ACC GGT TAC GGT Dly Ser Trp Glu Glu Ser Leu Ile Arg Pro Ile Ala Thr Gly Tyr Gly 180 185 190 195	1404
135 1453 GTT GTC TAC GTATGTCAT TCCTCTTCTT ATGATTATCT ATGTATAACA Val Val Tyr	
CGGACTAACG CGTAAACAG TAC GTC GAG CAC ATG ATT GGT CAC GGC ACC AAC Tyr Val Glu His Met Ile Ala His Ala Thr Asn 190 195	1504
GGC CAG GAG TCC TTC AAG GGC AAG CGC GTT GGC ATC TCC GGT TCC GGT Dly Glu Ser Phe Lys Gly Lys Arg Val Ala Ile Ser Gly Ser Gly 115 120 125 130	1552
AAC GTT GCC CAG TAC GCC GCC CTC AAG GTC ATT GAG CTC GGC GGT TCC Asn Val Ala Glu Tyr Ala Ala Leu Lys Val Ile Glu Leu Gly Gly Ser 135 140 145	1600
GTC GTC TCC CTG AGC GAC ACG CAG GGC TCC CTC ATC ATC AAC GGC GAG Val Val Ser Leu Ser Asp Thr Glu Gly Ser Leu Ile Ile Asn Gly Glu 150 155 160	1648
GGT AGC TTC ACC CCC GAG GAG ATC GAG CTC ATC GCT CAG ACC PAG GTC Gly Ser Phe Thr Pro Glu Glu Ile Glu Leu Ile Ala Glu Thr Lys Val 265 270 275	1696
GAG CGC AAC GAG CTC GCC AGC ATC GTC GGT GCT GCT CCC TTC AGC GAC Glu Arg Asn Glu Leu Ala Ser Ile Val Dly Ala Ala Pro Phe Ser Asp 280 285 290	1744
GCC AAC PAG TTC AAG TAC ATT GCT GGT GCC CGC CCC TGG GTT CAC GTC Ala Asn Lys Phe Lys Tyr Ile Ala Glu Ala Arg Pro Trp Val His Val 195 200 205 210	1792
GCC PAG GTC GAC TGC GCT CTC CCC TCC GCT ACC CAG AAC GAA GTT TCC Gly Lys Val Asp Val Ala Leu Pro Ser Ala Thr Glu Asn Glu Val Ser 315 320 325	1840
GGC GAG GAG GGT GTC CTC ATC AAC GCT GGC TGC AAG TTC ATC GCC Gly Glu Glu Ala Glu Val Leu Ile Asn Ala Glu Cys Lys Phe Ile Ala 330 335 340	1888
AGG GGT TGC AAC ATG GGT TGC ACC CAG GAG GGC ATC GAC ACC TTC GAG Glu Gly Ser Asn Met Gly Cys Thr Glu Ala Ile Asp Thr Phe Glu 345 350 355	1936
GCC CGC CGT AAC GCC AAC GCT GGC GCG GCT GGC ATC TGG TAC GCC CCC Ala His Arg Thr Ala Asn Ala Glu Ala Ala Ile Trp Tyr Ala Pro 360 365 370	1984
GGT AAG GCC BGC AAC GCC GGT GGT GCT GTC TCC CGT CTC GAG ATG Dly Lys Ala Ala Asn Ala Glu Glu Val Ala Ser Gly Leu Glu Met 375 380 385 390	2032
GGT CAG AAC TGT GGC CGC CTC AGC TGG ACT TCT GAG GAG GTT GAT GGC Ala Glu Asn Ser Asp Ala Arg Leu Ser Thr Ser Glu Glu Val Asp Ala 395 400	2080
GGT CTT AAG GAI ATG ATG TGC GAG TGC TGC AAG AAC AAT GAT GTC GAG ATG Arg Leu Lys Asp Ile Met Arg Asp Cys Phe Lys Asn Glu Leu Glu Thr 410 415 420	2128

EE-30-01 H

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 10-06-98

58

GCT CAG GAG TAC GCC ACC CCC GCT GAG GGT GTC CTG CCT TCC CTG GTG Ala Gln Glu Tyr Ala Thr Pro Ala Glu Gly Val Leu Pro Ser Leu Val 425 430 435	2176
ACC GGA TCC AAC ATT GCC GGT TTC ACC AAG GTG GCT GCC GCC ATG AAG Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys Val Ala Ala Ala Met Lys 440 445 450	2224
GAC CAG GGT GAC TGG TGG TAAATGCGGA AAGCCGCAAA CCCCCCGGGC Asp Gln Gly Asp Trp Trp 455 460	2272
TTATGTCATG ACCATTATGT AGTTTGATGT TCCCTTCAG CGCGGATGGA TAGAGGC GGTGTCTTGCT TGCTAGTTA GATGGATGCA TAATGATATC CTTTCTTAA TCCTCAAATT CTTGTAAATT GTTGTATCAA TAGTAGATAA TACAAGTGA GTCAACTACC CTTGCATCTT CACTATTGCA AGATGCATTC ATCTCTATTG CGAGCACATG CACAAACCCA TGGGACCGCA GTTCACTAGT ACTTAGCCTG TTATCTTCCC TCTATCCGAT CTTAAACAAAC TATCTAGA	2332 2392 2452 2512 2570

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 460 amino acids
(B) TYPE: amino acid
(D) TOPOLOGY: linear

(ii) MOLECULE TYPE: protein
(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Asn Leu Pro His Glu Pro Glu Phe Glu Gln Ala Tyr Lys Glu 1 5 10 15
Leu Ala Ser Thr Leu Glu Asn Ser Thr Leu Phe Gln Lys Asn Pro Glu 20 25 30
Tyr Arg Lys Ala Leu Ala Val Val Ser Val Pro Glu Arg Val Ile Gln 35 40 45
Phe Arg Val Val Trp Glu Asp Asp Ala Gly Asn Val Gln Val Asn Arg 50 55 60
Gly Phe Arg Val Gln Phe Asn Ser Ala Leu Gly Pro Tyr Lys Gly Gly 65 70 75 80
Leu Arg Phe His Pro Ser Val Asn Leu Ser Ile Leu Lys Phe Leu Gly 85 90 95
Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ala Leu Thr Gly Leu Asn Met Gly Gly 100 105 110
Gly Lys Gly Gly Ser Asp Phe Asp Pro Lys Gly Lys Ser Asp Asn Glu 115 120 125
Ile Arg Arg Phe Cys Val Ser Phe Met Thr Glu Leu Cys Lys His Ile 130 135 140
Gly Ala Asp Thr Asp Val Pro Ala Gly Asp Ile Gly Val Thr Gly Arg 145 150 155 160

00-30-01 H

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Glu Val Gly Phe Leu Phe Gly Gln Tyr Arg Lys Ile Arg Asn Gln Trp
 165 170 175
 Glu Gly Val Leu Thr Gly Lys Gly Ser Trp Gly Gly Ser Leu Ile
 180 185 190
 Arg Pro Glu Ala Thr Gly Tyr Gly Val Val Tyr Tyr Val Glu His Met
 195 200 205
 Ile Ala His Ala Thr Asn Gly Gln Glu Ser Phe Lys Gly Lys Arg Val
 210 215 220
 Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asn Val Ala Gln Tyr Ala Ala Leu Lys Val
 225 230 235 240
 Ile Glu Leu Gly Gly Ser Val Val Ser Leu Ser Asp Thr Gln Gly Ser
 245 250 255
 Leu Ile Ile Asn Gly Glu Gly Ser Phe Thr Pro Glu Glu Ile Glu Leu
 260 265 270
 Ile Ala Gln Thr Lys Val Glu Arg Asn Glu Leu Ala Ser Ile Val Gly
 275 280 285
 Ala Ala Pro Phe Ser Asp Ala Asn Lys Phe Lys Tyr Ile Ala Gly Ala
 290 295 300
 Arg Pro Trp Val His Val Gly Lys Val Asp Val Ala Leu Pro Ser Ala
 305 310 315 320
 Thr Gln Asn Glu Val Ser Gly Glu Ala Gln Val Leu Ile Asn Ala
 325 330 335
 Gly Cys Lys Phe Ile Ala Glu Gly Ser Asn Met Gly Cys Thr Gln Glu
 340 345 350
 Ala Ile Asp Thr Phe Glu Ala His Arg Thr Ala Asn Ala Gly Ala Ala
 355 360 365
 Ala Ile Trp Tyr Ala Pro Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val Ala
 370 375 380
 Val Ser Gly Leu Glu Met Ala Gln Asn Ser Ala Arg Leu Ser Trp Thr
 385 390 395 400
 Ser Glu Glu Val Asp Ala Arg Leu Lys Asp Ile Met Arg Asp Cys Phe
 405 410 415
 Lys Asn Gly Leu Glu Thr Ala Gln Glu Tyr Ala Thr Pro Ala Glu Gly
 420 425 430
 Val Leu Pro Ser Leu Val Thr Gly Ser Asn Ile Ala Gly Phe Thr Lys
 435 440 445
 Val Ala Ala Ala Met Lys Asp Gln Gly Asp Trp Trp
 450 455 460

68-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REIVINDICACIONES

1. Promotor para la expresión de proteínas recombinantes en hongos filamentosos, que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementaria- seleccionada del grupo formado por: a) la secuencia numerada 1-740 en SEQ ID No. 1; b) una secuencia análoga a la definida en (a); y una secuencia que, bajo condiciones estrictas, se hibridiza a la definida en (a).
10
2. Promotor según la reivindicación 1, donde la secuencia de nucleótidos es la secuencia numerada 1-740 en SEQ ID No. 1.
15
3. Promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de Aspergillus Niger.
4. Promotor gdh del gen de la glutamato deshidrogenasa de Aspergillus Niger var. Awamori.
20
5. Promotor gdhA del gen de la glutamato deshidrogenasa A de Aspergillus Niger var. Awamori.
- 25 6. Secuencia de ADN, purificada y aislada, que codifica la proteína glutamato deshidrogenasa y que comprende una secuencia de nucleótidos -o su complementaria- seleccionada del grupo formado por: a) la secuencia numerada 741-2245 en SEQ ID No. 1; b) una secuencia que es homóloga con la definida en (a); y c) una secuencia que, bajo condiciones estrictas, se hibridiza a la definida in (a).
30
- 35 7. Secuencia de ADN según la reivindicación 6, donde la secuencia de nucleótidos seleccionada es la

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

numerada 741-2245 en SEQ ID No. 1.

8. Secuencia de ADN según la reivindicación 7, donde
la proteína codificada es la glutamato deshidrogenasa
5 de un hongo filamentoso.

9. Secuencia de ADN según la reivindicación 8, donde
la proteína codificada es la glutamato deshidrogenasa
A de un hongo filamentoso.

10 10. Proteína codificada por cualquiera de las
secuencias de ADN definidas en la reivindicación 6.

11. Proteína codificada por cualquiera de las
15 secuencias de ADN definidas en la reivindicación 7.

12. Proteína codificada por cualquiera de las
secuencias de ADN definidas en la reivindicación 8.

20 13. Proteína que tiene la secuencia de aminoácidos en
SEQ ID No. 2.

14. Construcción de ADN que comprende: a) un promotor
definido in cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
25 b) una secuencia de ADN seleccionada del grupo
formado por el gen de la glucoamilasa de Aspergillus
Niger var. Awamori, el gen B2 de Acremonium
chrysogenum, y cualquiera de las secuencias de ADN
definidas en las reivindicaciones 6-9; c) una
30 secuencia espaciadora que, a su vez, contiene una
secuencia procesadora KEX2; y d) un gen codificador
de la taumatina.

15. Construcción de ADN según la reivindicación 14,
35 donde el promotor es el definido en la reivindicación

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5.

16. Construcción de ADN según la reivindicación 15, donde la secuencia de ADN in (b) es el gen de la glucoamilasa de Aspergillus Niger var. Awamori.

17. Construcción de ADN según la reivindicación 15, donde la secuencia de ADN en (b) es el gen B2 de Acremonium chrysogenum.

10

18. Construcción de ADN según la reivindicación 15, donde la secuencia de ADN en (b) es la secuencia de ADN definida en la reivindicación 8.

15 19. Construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 15-18, donde la secuencia de ADN en (d) es el gen sintético de la taumatina II proveniente del plásmido pThIX.

20 20. Cultivo de hongo filamentoso capaz de producir taumatina, que ha sido transformado con un plásmido que contiene una construcción definida en cualquiera de las reivindicaciones 14-19.

25 21. Cultivo según la reivindicación 20, donde el hongo filamentoso se selecciona del grupo formado por Aspergillus Niger y Aspergillus Niger var. Awamori.

30 22. Procedimiento de producción de taumatina que comprende los siguientes pasos:

a) preparación de un plásmido de expresión que contiene una construcción de ADN definida en cualquiera de las reivindicaciones 14-19;

35

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

b) transformación de una cepa de hongo filamentoso con dicho plásmido de expresión;

5 c) cultivo de la cepa transformada, en condiciones nutritivas apropiadas para la producción de taumatina, bien intracelularmente, bien extracelularmente, o bien de ambas maneras simultáneamente;

10 d) según el caso, separación y purificación de taumatina a partir del caldo de fermentación.

Madrid a,

Por mi colega
DOCTOR JESÚS JARA

do: JOSÉ JESÚS JARA

88-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 10-06-99

64

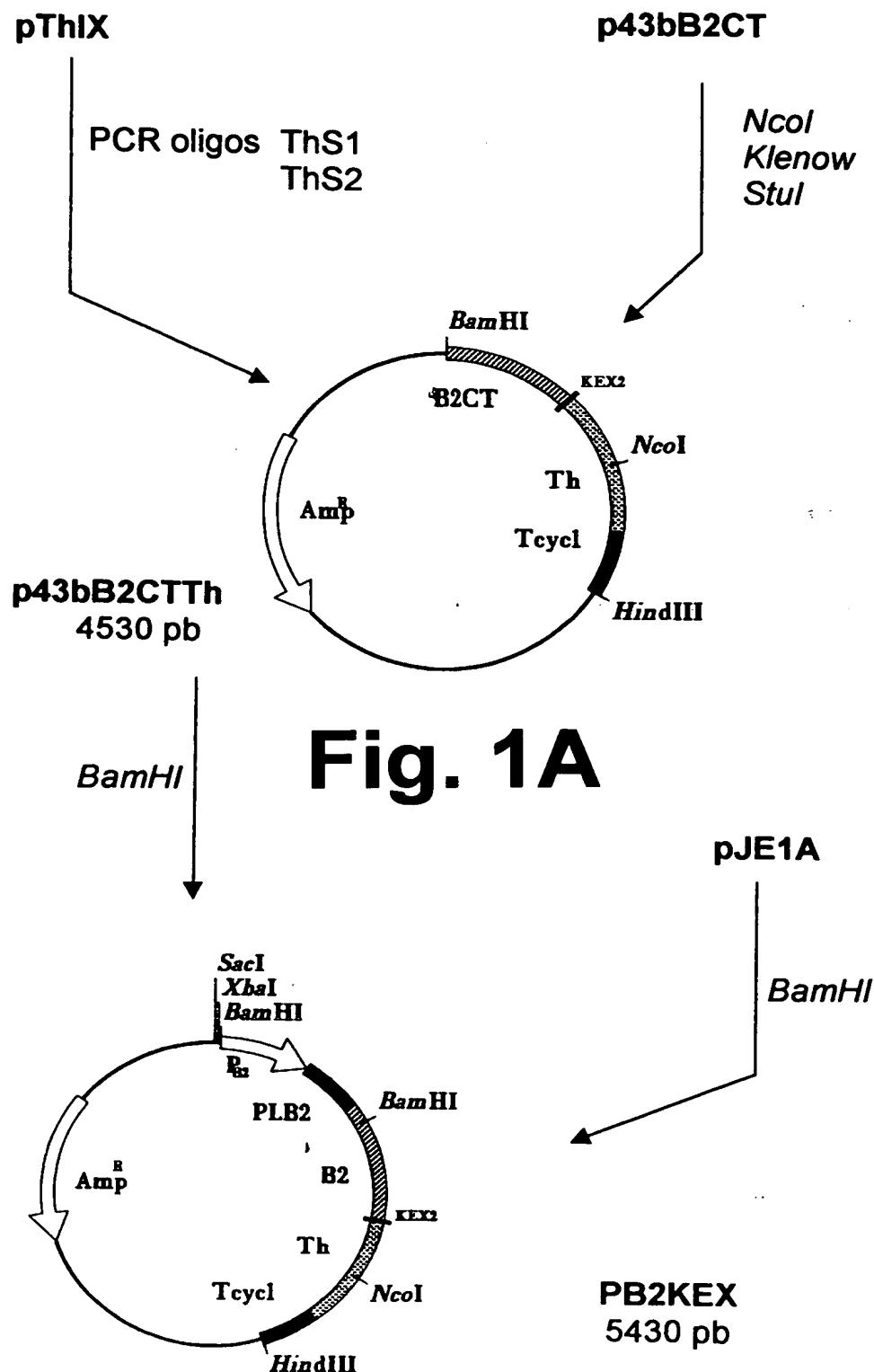
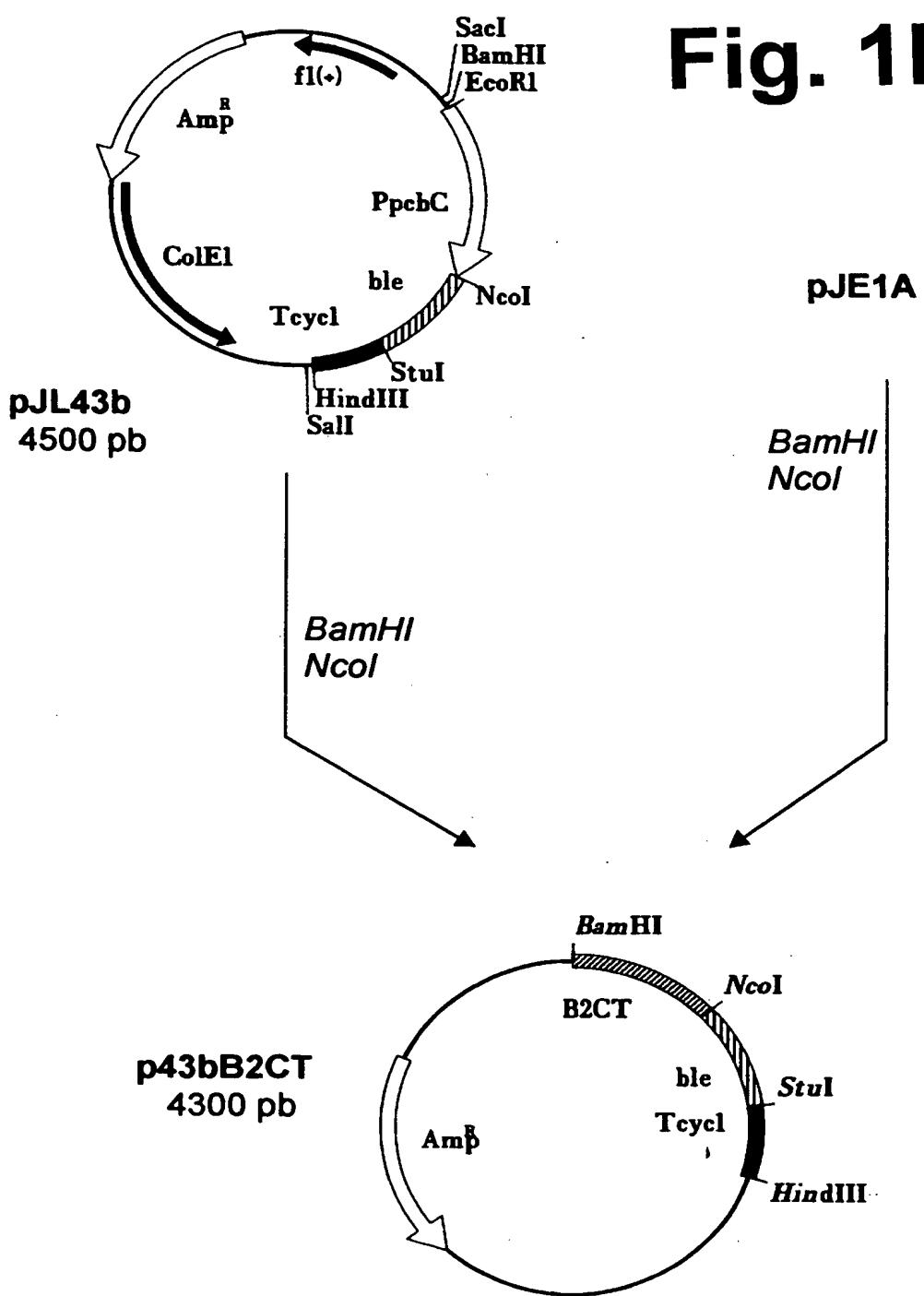


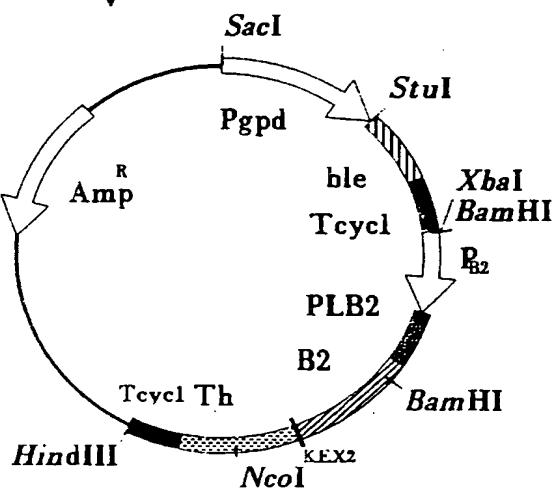
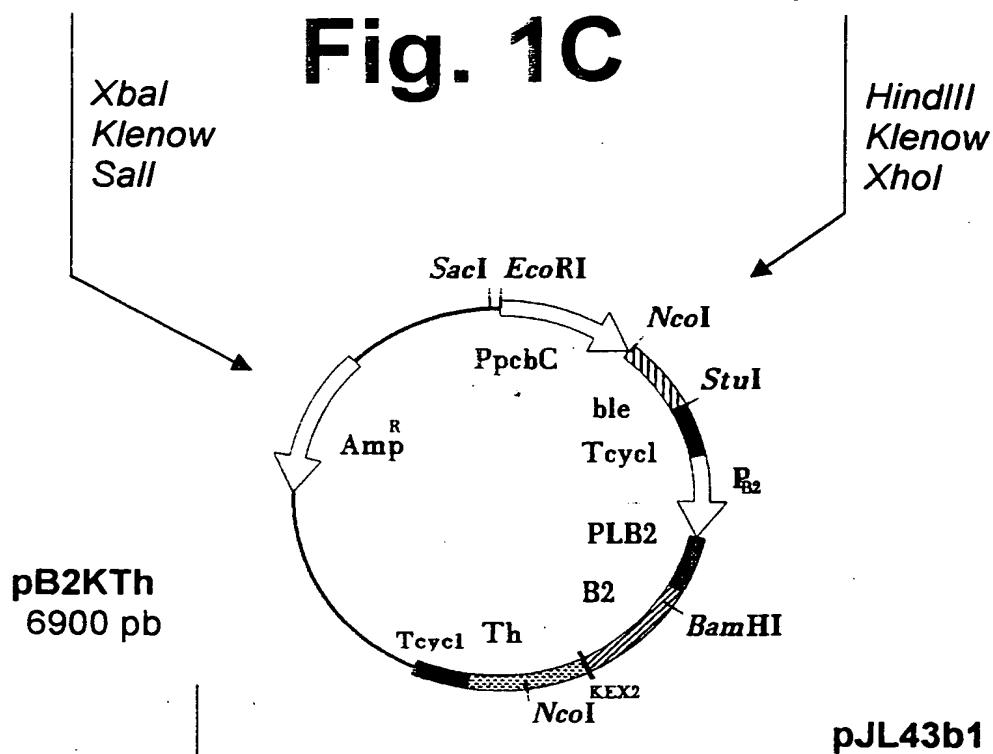
Fig. 1B



pB2KEX

pJL43b

Fig. 1C



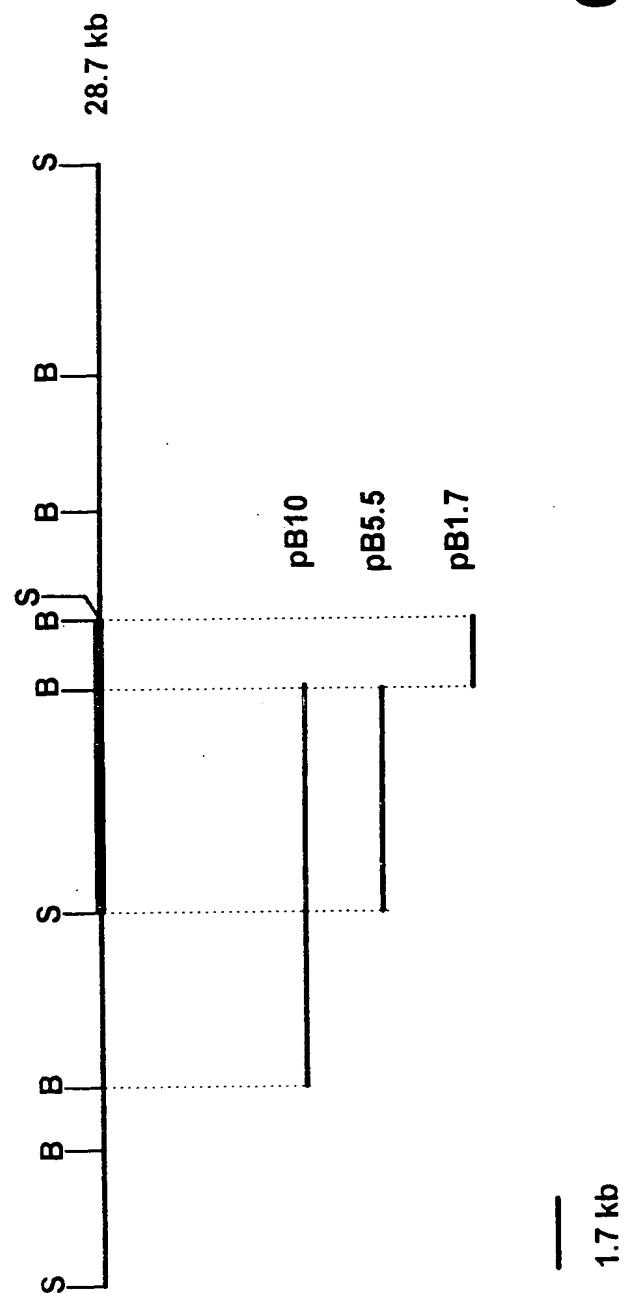
00-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 10-06-93

67

Fig. 2



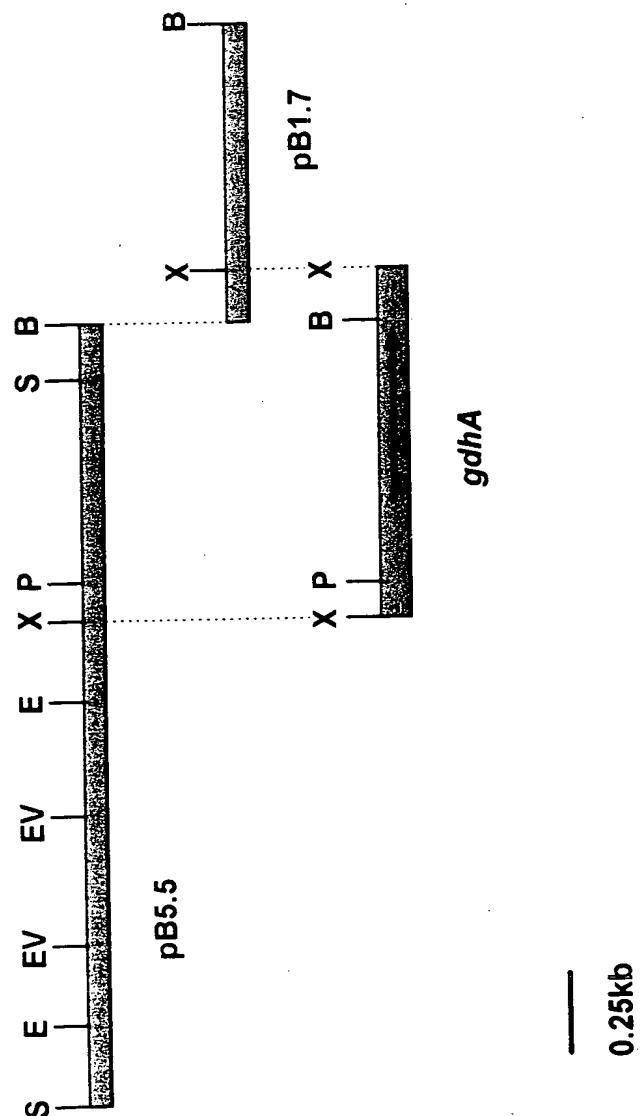
88-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 10-06-99

68

Fig. 3



88-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig. 4A

Aspergillus awamori
 Aspergillus nidulans
 Neurospora crassa
 Saccharomyces cerevisiae
 Schwanniomyces occidentalis
 Agaricus bisporus
 Salmonella typhimurium
 Escherichia coli
 Corynebacterium glutamicum

MSN..L..... PHEPEFEQAYKEILASTLENSTLFQKNPNEYRKA..LAVVSVPE 4
 MSN..L..... PVEPEFEQAYKEILASTLENSTLFQHPEYRRA..LQVVSVPE 4
 ..S.N..L..... PSEPEFEQAYKEIAYTLLENSLFLQKHPPEYRTA..LTVASLPE 4
 MS..... EPEFOQAYEEVVSLEDSTLFQHPEYRKV..LPIVSVPE 4
 MIKNGL..... PHEPEFOQAYNEVSALEESTLFTEKPEYKKV..IPVVSYPE 4
 MV..L..... PHEPEFEQALHELETSLO..PFLTTWPQYKKA..LEIIQVPE 4
 MDQTCLESFLNHVQKRDPHOTETFAQREVMTL..WPFFLEQNPRYRMSLRLVEPE 5
 MDQTYSLESFLNHVQKRDPNQTEFAQAVREVMTL..WPFFLEQNPKYRQMSLRLVEPE 5
 MTVDEQVSNNYYDMJLKRNAGEPEFHQAQAEVLESL..KLVLEKDPHYADYGLQLCEPE 5

a RVIQFERYWEDDAGNVQVNQFRVQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLNMGGKGG. SDFDPKGKSDNEIRRFC 13
 RVIQFERYWENDKGEVQINRGYRVQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLNMGGKGG. SDFDPKGKSDSEIRRFC 13
 RVIQFERYWEDDNGNQVQNRYRQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLSMGGKGG. ADFDPKGKSDAEIRRFC 13
 RIIQFERYWENDKGEQEVQAGYRVQYNSAKGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNSLTGLDMGGKGGLC. VDLKGRSSNEIRRFC 13
 RIIQFERYWENDNGDVEVNNNGFRVQFNSSLGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLSMGGKGG. CDFNPKGRSDEIRRFC 12
 RVIQFERYWEDDQGKPVQVNQFRVQYNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLSMGGKGG. SDFDPKGKSDNEIRRFC 13
 RVIQFERYWLDKNOQVQNRAWRQFNSAIGPYKGGMRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTTLPMGGKGG. SDFDPKGKSEGEVMRFC 14
 RVIQFERYWDDRNQIQVNRAWRQFSSAIGPYKGGMRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTTLPMGGKGG. SDFDPKGKSEGEVMRFC 14
 ROLIERYWDDQGVHVNQFRVQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLGIVKFLIGFEEQIFKNSLTGLPIGGKGG. SDFDPKGKSDLEIMRFC 14

b RVIQFERYWEDDAGNVQVNQFRVQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLNMGGKGG. SDFDPKGKSDNEIRRFC 13
 RVIQFERYWENDKGEVQINRGYRVQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLNMGGKGG. SDFDPKGKSDSEIRRFC 13
 RVIQFERYWEDDNGNQVQNRYRQFNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLSMGGKGG. ADFDPKGKSDAEIRRFC 13
 RIIQFERYWENDKGEQEVQAGYRVQYNSAKGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNSLTGLDMGGKGGLC. VDLKGRSSNEIRRFC 13
 RIIQFERYWENDNGDVEVNNNGFRVQFNSSLGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLSMGGKGG. CDFNPKGRSDEIRRFC 12
 RVIQFERYWEDDQGKPVQVNQFRVQYNSALGPYKGGLRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTGLSMGGKGG. SDFDPKGKSDNEIRRFC 13
 RVIQFERYWLDKNOQVQNRAWRQFNSAIGPYKGGMRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTTLPMGGKGG. SDFDPKGKSEGEVMRFC 14
 RVIQFERYWDDRNQIQVNRAWRQFSSAIGPYKGGMRFHPSVNLISILKFLIGFEEQIFKNALTTLPMGGKGG. SDFDPKGKSEGEVMRFC 14

c VSFNTTELCKHIGADTDVPGADIGVTGREYGFQYRKIRNQWEG. VLTGKGGSGWGGSLIRPEATGYVVVYVEHMIAHATNGQESFKGK 22
 TAFNTTELCKHIGADTDVPGADIGVTGREYGFQYRRIRNQWEG. VLTGKGGSGWGGSLIRPEATGYVVVYVQHMIKHTVGGKESFKGK 22
 CAFNTELHKHIGADTDVPGADIGVGREIGYMFAYRKAAANREFG. VLTGKGLSGWGGSLIRPEATGYLVVYVGHMLEY..SGAGSYAGK 21
 YAFNREYRSHIGQDTDVPAGDIGVGREIGYLGAYRSYKNSWEG. VLTGKGLNWGGSLIRPEATGYLLYYYTQAMIDYATNGKESFEKG 21
 VAFNTRQARYIGADTDVPGADIGVGREIGYLGAYKOMONNWYG. VLTGKGLTWGGSLIRPEATGYVSFTTLKKMIEKATNGKESFKGK 22
 VAFNSELSEFRHIGQDTDVPAGDIGTGAREIGFLGAYRRLKNEFTG. MLTGKGINWGGSFIRPEATGYLIYYVEHMIAHACPE...YSLD 21
 QALIATEYRHLGPDTDVPAGDIGVGREYGFMAGMMRKLSN. NSSCVFTGKGLSFGGSLIRPEATGYLVYFTTEAMLKRHGLG...FEGM 23
 QALIATEYRHLGADTDVPGADIGVGREYGFMAGMKKLSN. NTACVFTGKGLSFGGSLIRPEATGYLVYFTTEAMLKRHGMG...FEGM 23
 QSFNTTEHRHIGEYRDLPGADIGVGREIGYLGAYRRLKNEFTG. VLTGKGLTWGGSLVREATGYCYYFVSEMIKAGES...ISGQ 23

Fig. 4B

R...VAISGSGNVAQYAALKVIELGGSVVSLSDTQGSLLINGEG. SFTPEEIELIAQTVERNELASIVGAAP. FSDANKFYIAGAR 305
 R...VAISGSGNVAQYAALKVIELGGSVVSLSDTQGSLLINGEG. SFTPEEIALIADLKVARQKQSELATSSA. FAG. KFTYIPDAR 304
 R...VALSGSGNVAQYAALKLIELGATVVLSLSDSKGALVATGESG. ITVEDINAVMAIKEARQSLTS. FOHAGHLKWIEGAR 296
 R...VTISGSGNVAQYAALKVIELGGTUVLSLSDSKGCILLET. GITSEQAVAVISSAKVNFKSLEQIVNEYSTF. SENKVQYIAGAR 299
 R...VELSGSGNVAQYAALKVIELGGTUVLSLSDSKGSIVSKN. GIVPEQVLEIAPAKLKFKRSLEEITKESVKLFSGENSVEYLAGVR 307
 RPSTLVAISGSGNVSQFTALKVIELGATVLSLSDSKGSLLSEK. GYTKEAIEKIAEILKLKGGALEAIVDLGAGYT. YHAGKR 297
 R...VAVSGSGNVAQYAIEKAMAFGARVVTASDSSGTVV. DESGFTPEKELARICEIKASRDG. RVDAYARDF.G...LTYLEGQQ 309
 R...VSUSGSGNVAQYAIEKAMAFGARVITASDSSGTVV. DESGFTPEKELARICEIKASRDG. RVDAYAKEF.G...LVYLEGQQ 309
 K...LIVSGSGNVAQYAIERKAQELGATVIGFSDSSGWVH. TPNGVD. VAKLREIREVRA. RVSVYADEVEG. ATYHTDGS 308

f

g

h

PWVHV. GKVDAIPCATONEVSSEE. AOVLINAGCKFIAEGGSNNMGCTOEATDTFEAHTANAGAA. AIIWYAPGKIAANAGGVAVSGLEMAQ 392
 PWTNIIPGKFEVALPSATONEVSSEE. AEHLIKSGVRYIAEGGSNNMGCTQBAIDIFEAHRNANPGDA. IWIYAPGKIAANAGGVAVSGLEMAQ 391
 PWLHV. GKVDAIPCATONEVSSEE. AEGLLAAGCKFVAEGGSNNMGCTLEAIEFENNRKEKKGEA. VVYAPGKIAANAGGVAVSGLEMAQ 382
 PWTHV. QKVDAIPCATONEVSSEE. AKALVAQGVKFKIAEGGSNNMGSTPEAIAVFETARSTATGSEAVWYGGPKIAANLGGVAVSGLEMAQ 387
 PWAKV. GHFDVALPSATQEVSGEEAKALVEAGCKYIAEGGSNNMGSTKEDIDVFEANR. SNNWYAPGKIAANAGGVAVSGLEMAQ 390
 PWTLLP. QVHIALPGATONEVS. QEEAALVKGTRIVAEGGSNMGCTEEIAIFENSRRASRAG. VVYAPGKASNCNGGVAVSGLEMAQ 382
 PWSV. . PVDIALPCATONELDVDA. ARVLIANGVKAVAEGANMPPTIETADLFLEA. GVLFAPGKIAANAGGVAVSGLEMAQ 386
 PWSL. . PVDIALPCATONELDVDA. AHOLLIANGVKAVAEGANMPPTIETEFOQA. GVLFAPGKIAANAGGVAVSGLEMAQ 386
 IWDL. . KCDIALPCATONENLGEN. AKTLADNGCRFVAEGANMPSTPEAVEVFRER. DIRFGPGRATPEAVEVFRERDIRF 385

i

NSARLSWTSEEVDARLKDIMRDCFKNGLETAQEYATPA. EG. VLPSLVTGSNNIAGETKVAIAKDDGDDW. 460
 NSARLSWTSEEVDARLKGIMEDCFKNGLETAQKFATPA. KG. VLPSLVTGSNNIAGETKVAIAKDDGDDW. 459
 NSQRLNWTQAEVDEKLKDIMKNAFFNGLNTAKTYVEAA. EG. EPLSLVAGSNIAGETKVAQNMHDQGDDW. 453
 NSQRITWTSERVDQELKRIMINCIDYAKYT. K. DGKVPLSLVKGANIAIFIKVSDAMFDDGDD. VF 454
 NSQRVQWSAEEVDAKLKNIMYTCFDNCYDPAIKYSAEK. NADGLPLSLVKGANIAIFIKVADAMFDDGDD. VY 459
 NSQRLAWSTQEVDAKLKSIMAECYQICYTAGSRWSGEKVAEGVAEALPSLLSGANLAGEIKVADAMKEQGDDW. 457
 NAARLSWKAEKVDAARLHHIMLDIHACEYGGD. NKHT. NYQGANIAIAGEVKVADANLQG. V1 447
 NAARLGWKAEKVDAARLHHIMLDIHACEVHGGE. GEQT. NYQGANIAIAGEVKVADANLQG. V1 447
 GPGKAVNVGGVATSALEMQNASRETCAETAAYGHEN. DVVVGANIAIAGEKKVADANLQG. V1 447

M 10-06-33

71

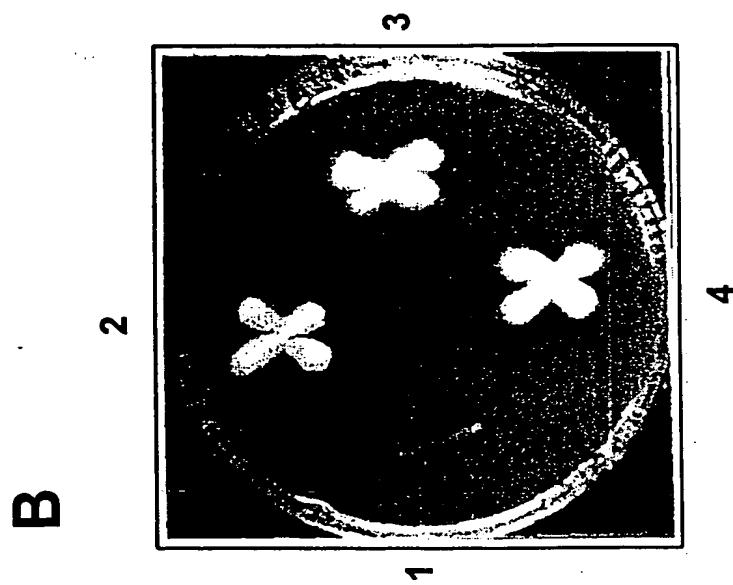
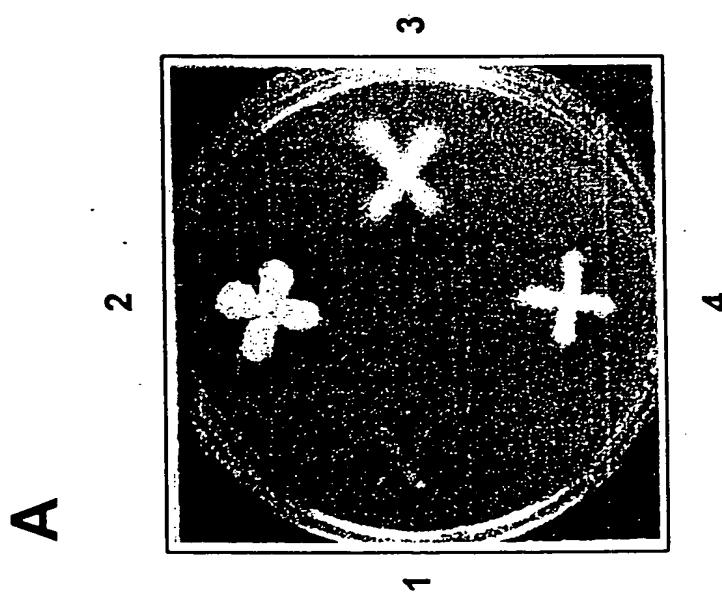


Fig. 5



EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 10-06-93

72

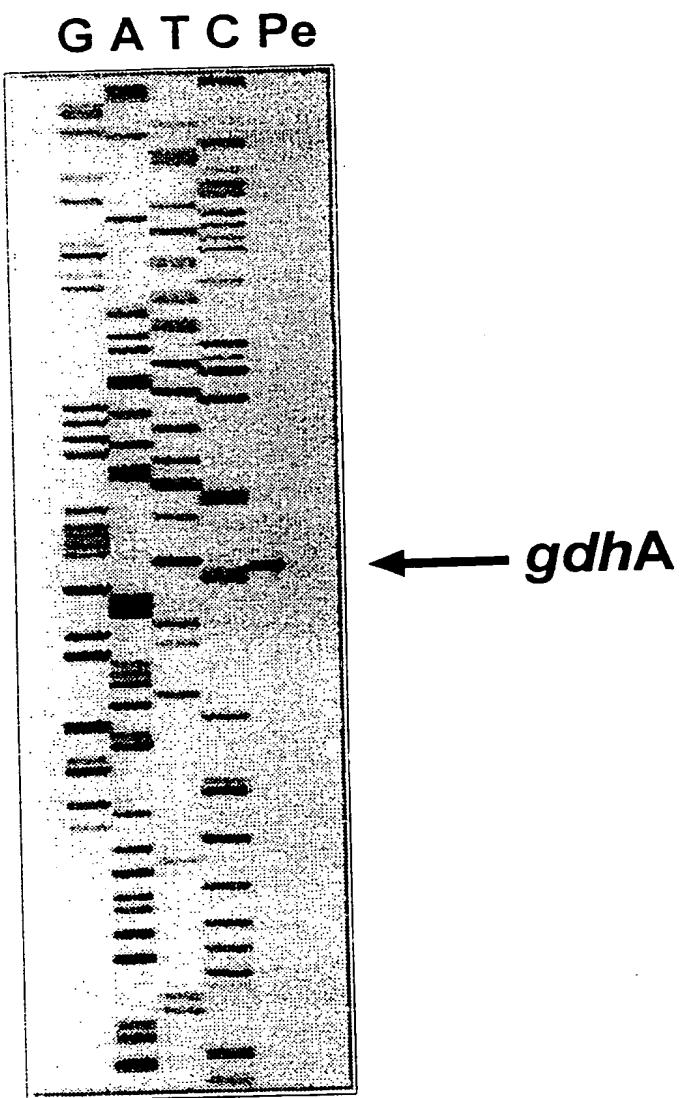


Fig. 6

88-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 10-06-99

73

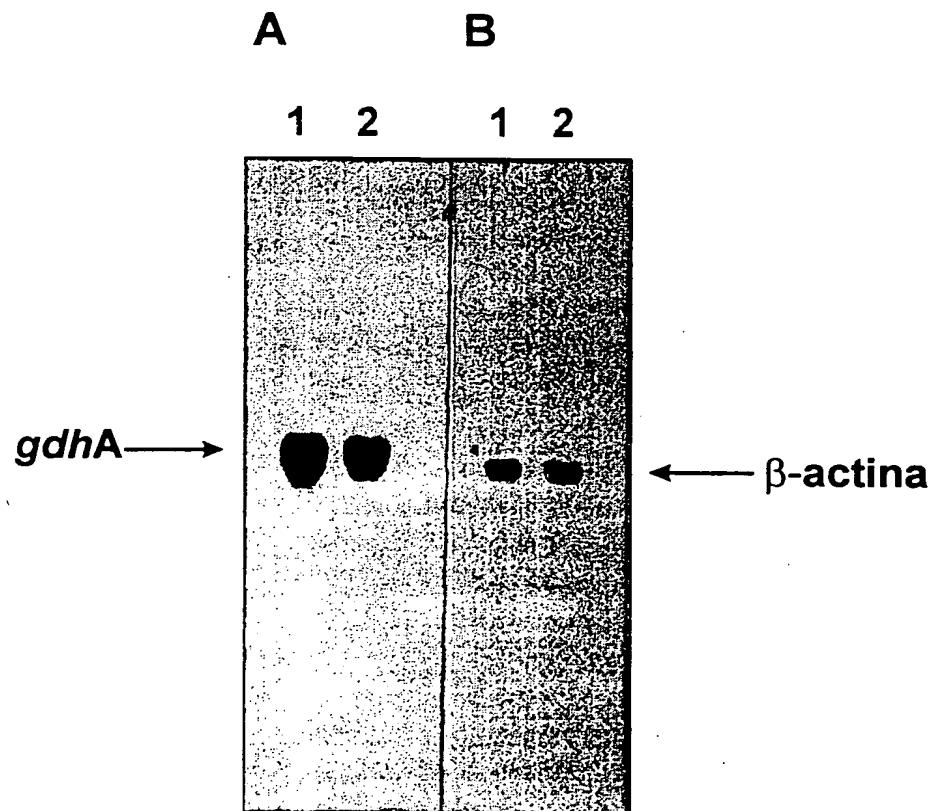
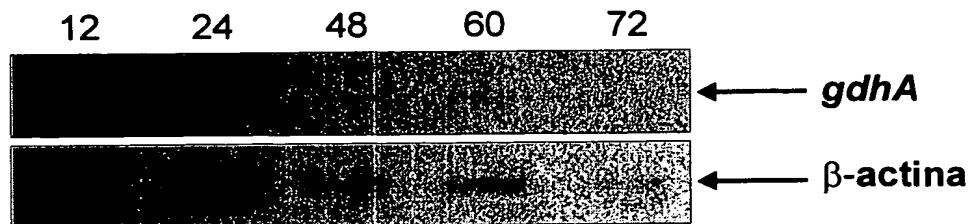
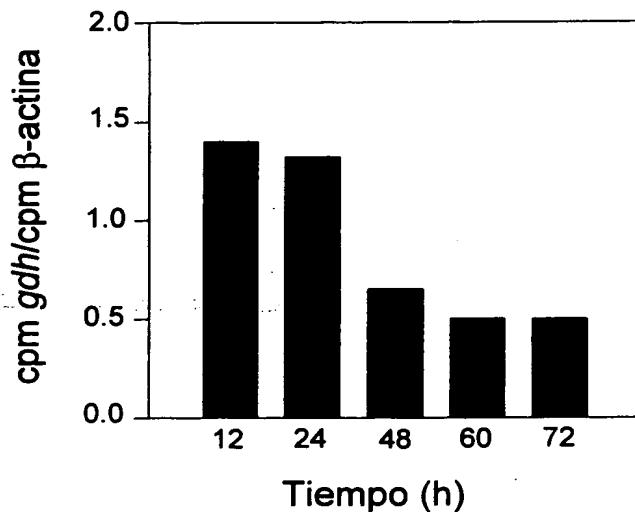
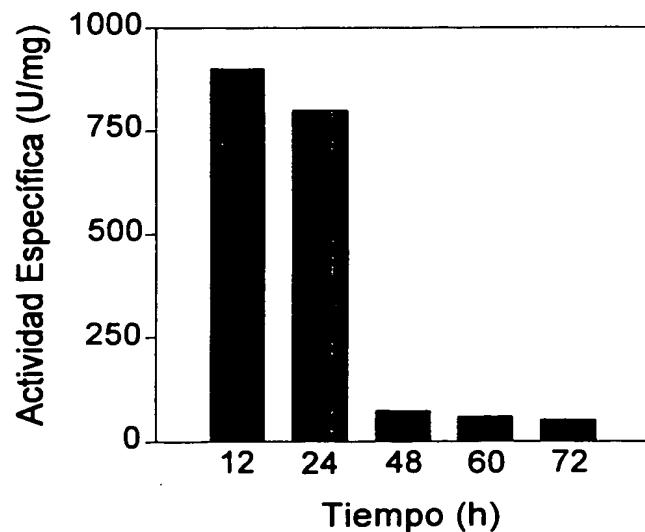
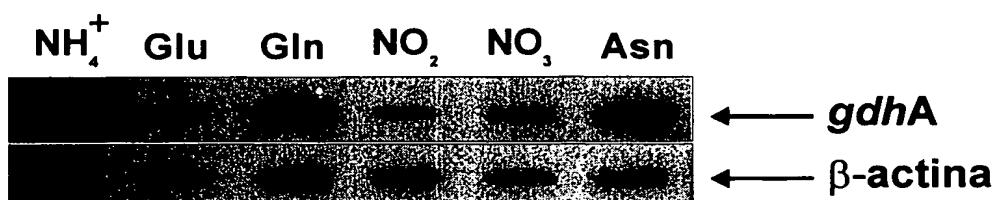
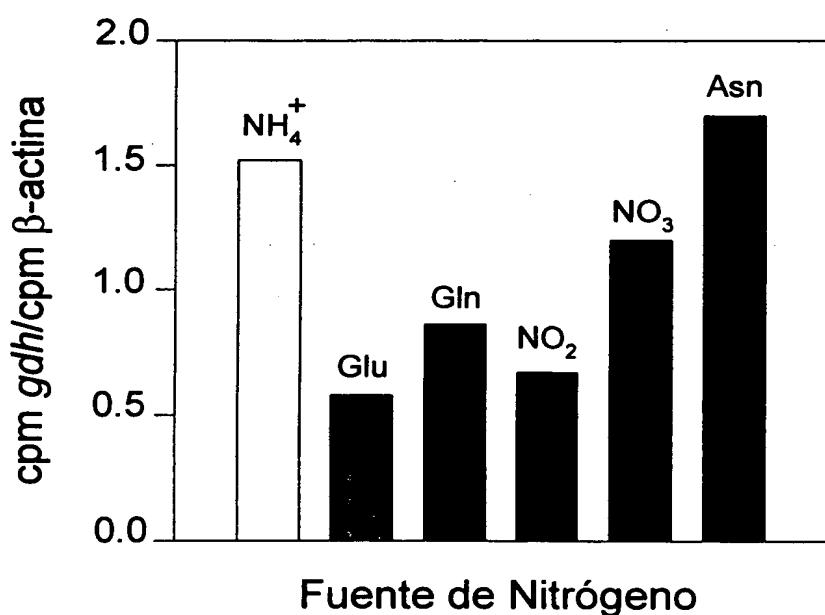


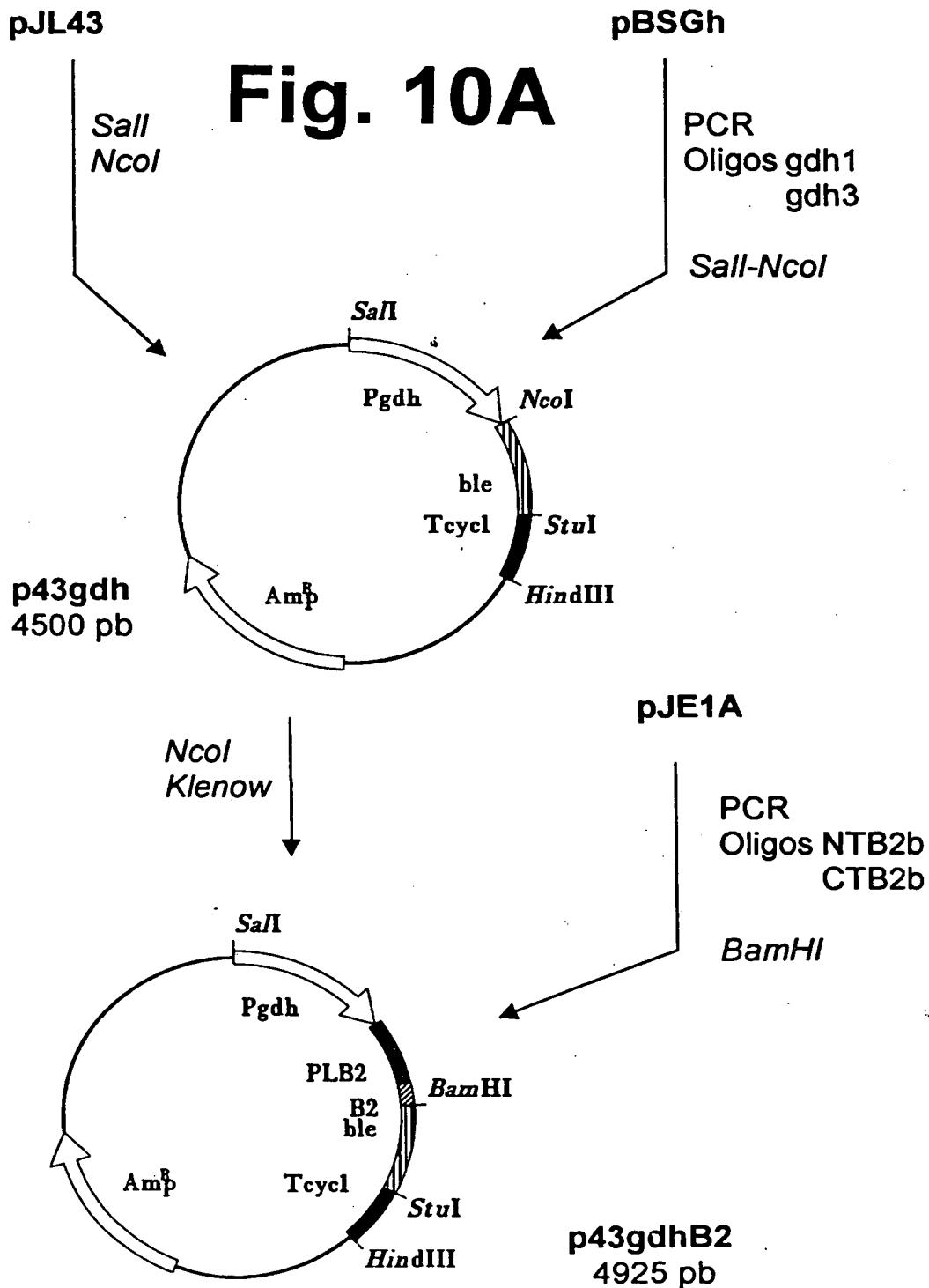
Fig. 7

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

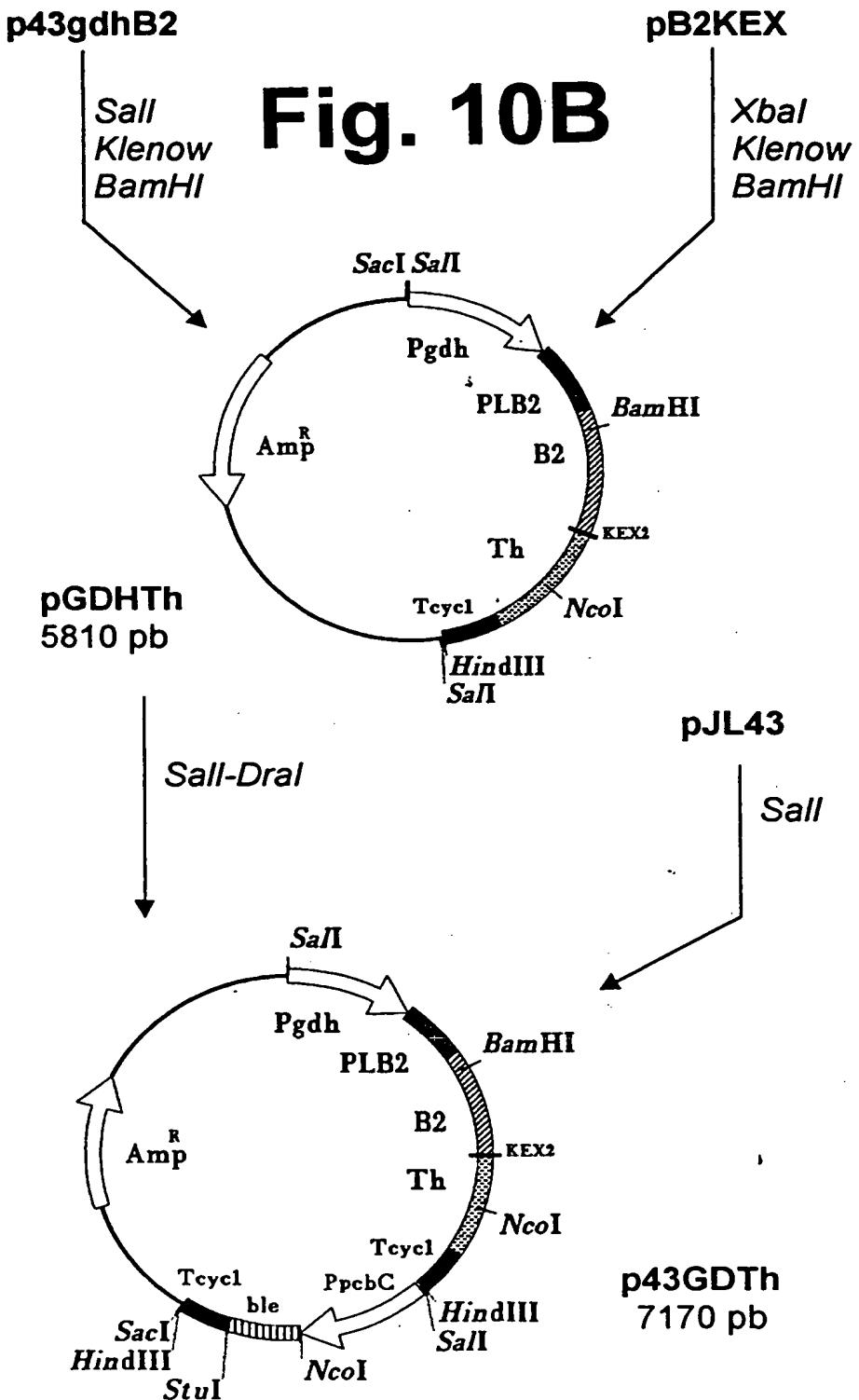
A**B****C****Fig. 8**

A**B****Fig. 9**



EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)



EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 10-06-99

78

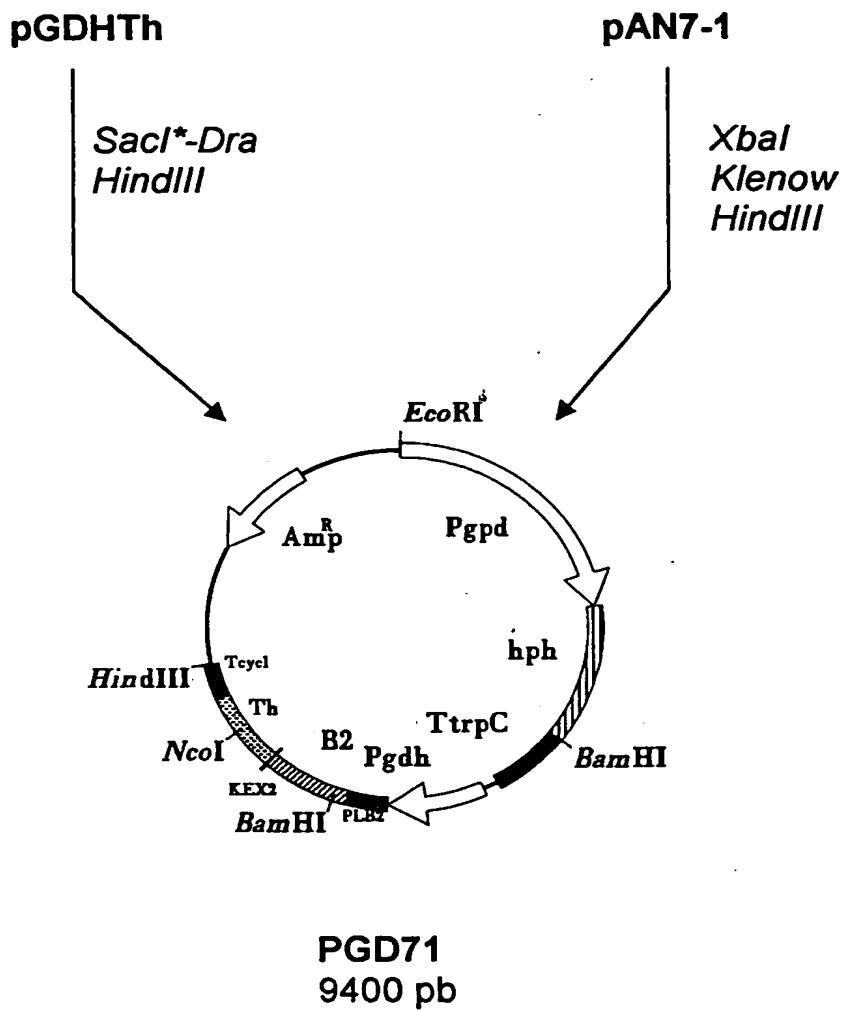
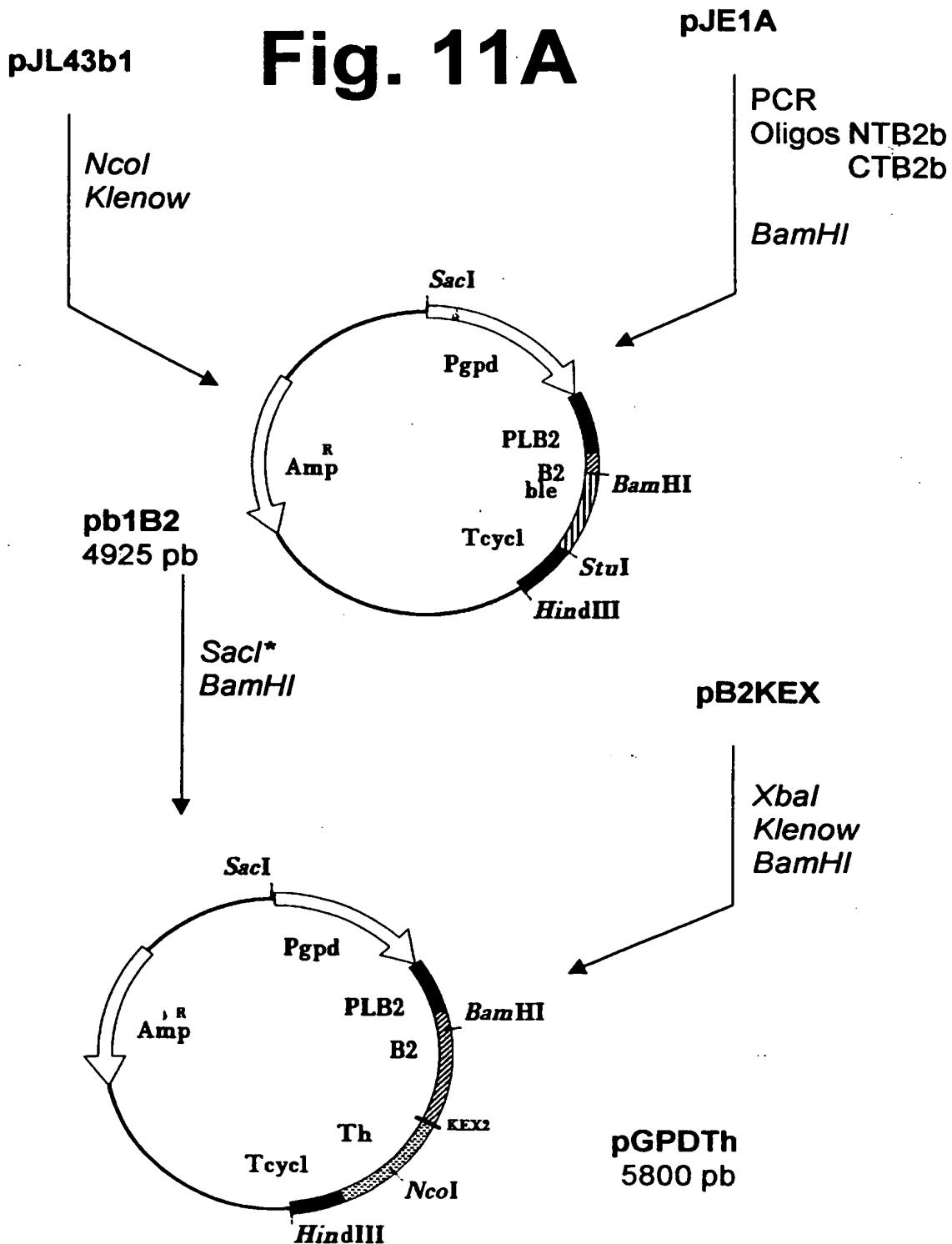


Fig. 10C

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)



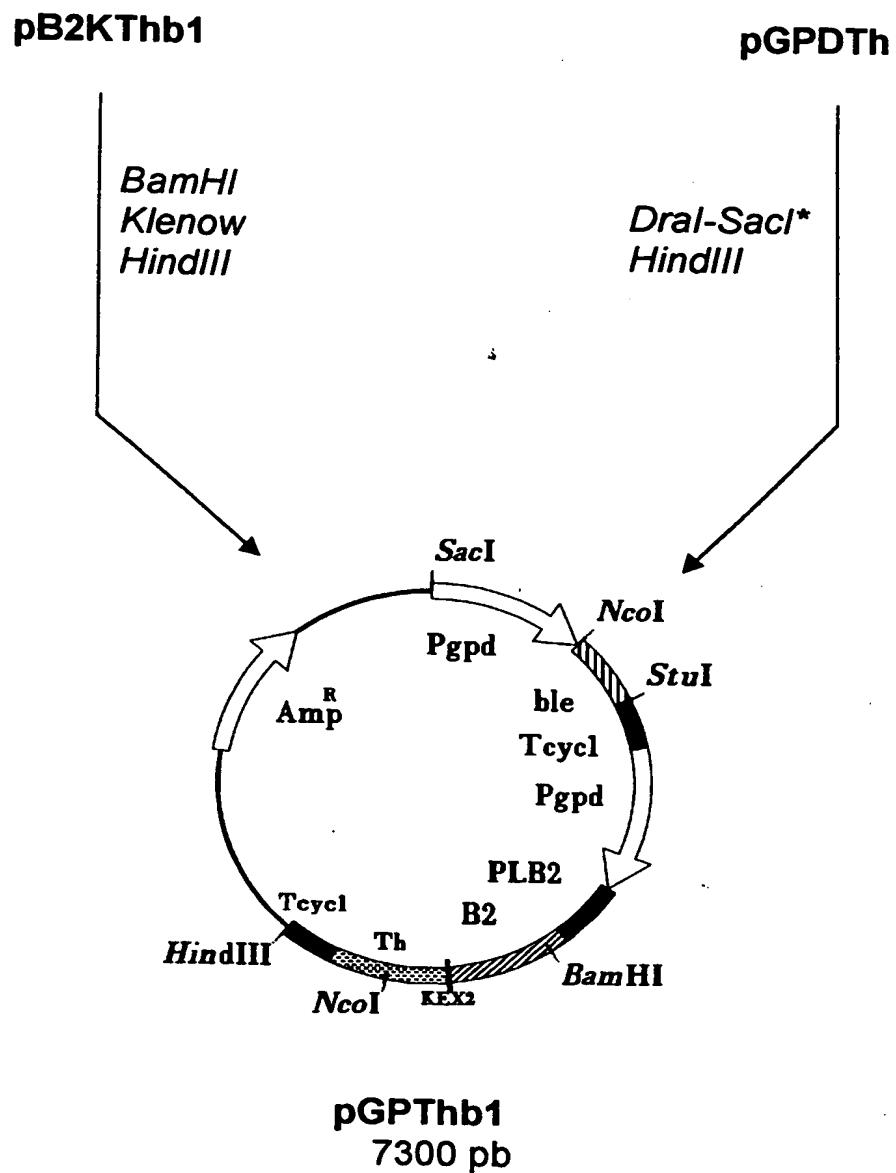


Fig. 11B

M 10-06-99

81

TB2b1-44 y TGDT_h-4

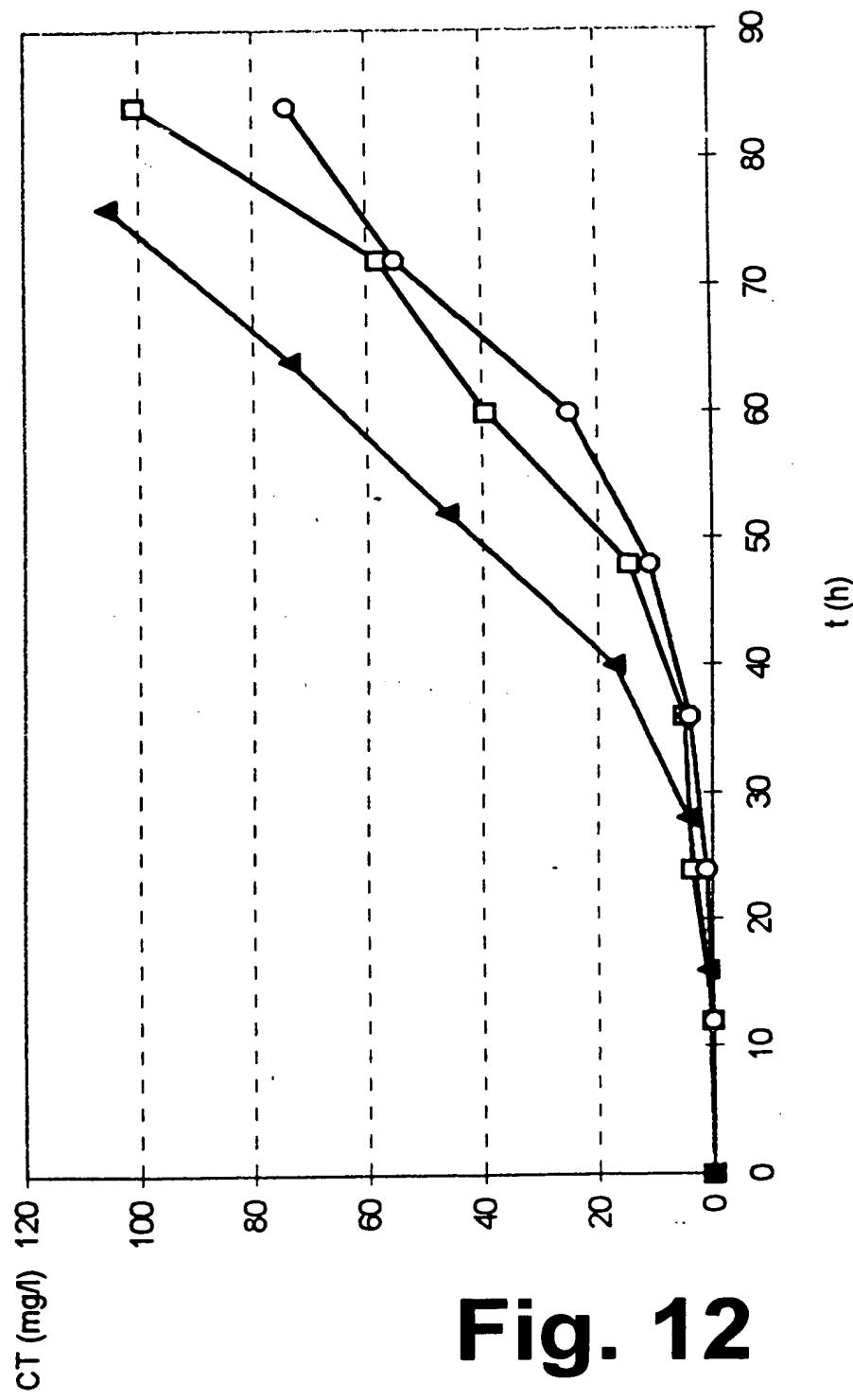


Fig. 12

EE-30-01 M

THIS PAGE BLANK (USPTO)